N° D'ORDRE au C.N.R.S.
AO 5407

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Daniel THOMAS

Sujet de la Thèse : "Elaboration de modèles biologiques structurés à l'aide de membranes porteuses d'enzymes réticulées."

présentée et soutenue le Juin 1971

MM.	F. MOREL,	Professeur au Collège de France	Membres d'honneur
	J.L. FUNCK-BRENTANO	Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de PARIS.	
	P. ROLLIN,	Doyen de la Faculté des Sciences de ROUEN.	Président
	G. BROUN,	Professeur à la Faculté de Médecine de ROUEN.	Examinateurs
	E. SELEGNY,	Professeur à la Faculté des Sciences de ROUEN.	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544705_0022

N° D'ORDRE au C.N.R.S.
AO 5407

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Daniel THOMAS

Sujet de la Thèse : "Elaboration de modèles biologiques structurés à l'aide de membranes porteuses d'enzymes réticulées."

présentée et soutenue le Juin 1971

MM.	F. MOREL,	Professeur au Collège de France	Membres d'honneur
	J.L. FUNCK-BRENTANO	Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de PARIS.	
	P. ROLLIN,	Doyen de la Faculté des Sciences de ROUEN.	Président
	G. BROUN,	Professeur à la Faculté de Médecine de ROUEN.	Examinateurs
	E. SELEGNY,	Professeur à la Faculté des Sciences de ROUEN.	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME

A MES PARENTS

JE ME SENS PROFONDEMENT HONORE DE LA GRANDE FAVEUR QUE M'A FAITE, MONSIEUR FRANCOIS MOREL, PROFESSEUR AU COLLEGE DE FRANCE, EN ACCEPTANT D'ETRE MEMBRE D'HONNEUR DE MON JURY. QU'IL VEUILLE BIEN ACCEPTER MES TRES RESPECTUEUX REMERCIEMENTS POUR L'INTERET QU'IL A BIEN VOULU PORTER A CE TRAVAIL DEPUIS PLUSIEURS ANNEES DEJA.

MONSIEUR JEAN-LOUIS FUNCK-BRENTANO, PROFESSEUR A LA FACULTE DE MEDECINE DE PARIS A BIEN VOULU ACCEPTER DE SE DEPLACER A ROUEN POUR JUGER CE TRAVAIL. QU'IL VEUILLE BIEN ACCEPTER MES TRES RESPECTUEUX REMERCIEMENTS.

JE SOUHAITE EXPRIMER MA PROFONDE GRATITUDE A MONSIEUR GEORGES BROUN, PROFESSEUR A LA FACULTE DE MEDECINE DE ROUEN, QUI M'A ACCUEILLI DANS SON LABORATOIRE, A PROPOSE CE SUJET DE RECHERCHE, ET M'A MONTRE LES VOIES DE SA REALISATION. SON DYNAMISME, LA CORDIALE ATMOSPHERE QU'IL SAIT CREER AUTOUR DE LUI, RESTERONT POUR MOI DES EXEMPLES.

MONSIEUR LE DOYEN PAUL ROLLIN QUI, EN DEPIT DE SES LOURDES TACHES, A BIEN VOULU PRESIDER MON JURY, TROUVERA ICI LE TEMOIGNAGE DE MA VIVE RECONNAISSANCE.

JE DESIRE EXPRIMER MA VIVE RECONNAISSANCE A MONSIEUR LE PROFESSEUR ERIC SELEGNY, QUI A ACCEPTE D'ETRE MEMBRE DE MON JURY ET QUI N'A JAMAIS MENAGE SES EFFORTS POUR FAIRE CONNAITRE CE TRAVAIL.

JE TIENS A REMERCIER VIVEMENT MONSIEUR STRATIS AVRAMEAS MAITRE DE RECHERCHES AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, POUR SON AIDE AU DEBUT DE CE TRAVAIL QUI LUI DOIT BEAUCOUP, AINSI QUE MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE JEAN-CLAUDE KAPLAN POUR SA CLARTE DE SES CONSEILS.

MES CAMARADES DE LABORATOIRE ONT TOUJOURS FAIT REGNER DANS L'EQUIPE UN CLIMAT DE BONNE ENTENTE, DE DISCUSSIONS FRUCTUEUSES ET UNE AMBIANCE SYMPATHIQUE QUI M'A BEAUCOUP AIDE AU COURS DE CE TRAVAIL.

JE TIENS A REMERCIER ICI MADEMOISELLE GUILLON QUI A MIS SES COMPETENCES TECHNIQUES AU SERVICE DE CES RECHERCHES.

LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MEDICALE DE L'HOPITAL CHARLES NICOLLE TROUVERA ICI LA MARQUE DE MA GRATITUDE POUR LA SYMPATHIE QU'IL M'A TOUJOURS TEMOIGNEE. JE TIENS, EN PARTICULIER, A REMERCIER MADAME ACCARD QUI A LARGEMENT CONTRIBUE A LA PRESENTATION GRAPHIQUE DE CETTE THESE.

MA RECONNAISSANCE S'ADRESSE AUSSI A LA SECTION PATHOLOGIE EXPERIMENTALE DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR SON AIDE ET A LA DELEGATION GENERALE A LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE POUR SON APPUI FINANCIER.

* *

*

Les progrès effectués ces dernières années dans la connaissance des structures subcellulaires ont permis de montrer l'existence d'un grand nombre d'enzymes différentes liées à des structures membranaires.

Parallèlement, diverses réactions métaboliques ont été impliquées dans le transfert des métabolites à travers les membranes et au sein des organites cellulaires.

Elles sont citées à propos des phénomènes de transport actif et facilité pour les ions, les acides aminés, les sucres. Le rôle essentiel joué par ces enzymes membranaires pousse le chercheur à expliquer leur fonctionnement dans les mécanismes de perméation des métabolites.

Différents auteurs ont proposé pour expliquer les mécanismes possibles de ces phénomènes des hypothèses utilisant des modèles descriptifs. Ces modèles ont été passés en revue et classés par STEIN (1967).

Ces modèles descriptifs sont d'un grand intérêt parce qu'ils avancent des hypothèses et suscitent des discussions, mais ils ne permettent pas d'élucider les mécanismes ou les principes physico-chimiques sous-jacents à ces phénomènes de transfert.

La nécessité de réaliser des modèles physico-chimiques simples à l'aide de membranes artificielles pour élucider certains de ces mécanismes apparait donc clairement. De tels modèles ont surtout été réalisés à l'aide de couches lipidiques, pour obtenir des renseignements sur la structure et la sélectivité de tels films dans les milieux biologiques. Les modèles réalisés avec des films protéiques ont eu un développement beaucoup plus restreint. Cette lacune s'explique sans doute par le fait que les méthodes d'étalement employées pour obtenir des films protéiques provoquent généralement la dénaturation des molécules

et la perte de leurs activités biologiques.

NIMS (1968) d'une part, et PASYNSKY et coll. (1964) d'autre part, ont réalisé des modèles en couplant des activités enzymatiques en solution avec une membrane inactive. Ces modèles permettaient une approche des problèmes posés par le couplage de la diffusion et du métabolisme mais ce n'étaient pas de véritables modèles membranaires, et ils ne pouvaient étudier de cette manière les caractéristiques physico-chimiques propres à cette forme.

Ces renseignements ne peuvent être obtenus qu'avec des modèles qui couplent diffusion et réaction enzymatique au sein même de la structure membranaire. Cette combinaison est en effet une des caractéristiques fondamentales des réactions enzymatiques dans un système structuré.

La fixation artificielle par liaisons covalentes d'enzymes en phase insoluble permet d'aborder l'étude de la loi cinétique qui gouverne cette "enzymologie hétérogène".

La forme membranaire se prête spécialement au stade initial de ce type d'études car elle permet de privilégier une dimension, ce qui facilite l'approche théorique des systèmes. Pour y parvenir, nous avons mis au point des méthodes de fabrication de membranes porteuses d'enzymes fixées par liaisons covalentes. Ces techniques permettent de lier des molécules biologiques entre elles ou sur un support selon une répartition définie, sans altérer leur activité.

Le fonctionnement de ces membranes est régi par deux phénomènes simultanés : la diffusion des métabolites au sein de la structure membranaire et la réaction enzymatique. Ces diffusion-réactions ont été suivies expérimentalement et analysées mathématiquement ; les équations établies permettent de rendre compte des résultats expérimentaux.

La bibliographie fait état d'une seule autre tentative visant à réaliser et à étudier des membranes artificielles

porteuses d'enzymes liées par covalence.

GOLDMAN et coll. (1968_a, 1968_b, 1971) ont présenté les résultats obtenus avec une membrane de collodion porteuse d'activité papaïne. La méthode employée pour réaliser ces membranes nécessite, avant utilisation de tels systèmes comme modèles, une étude théorique et expérimentale complexe pour connaître la répartition des sites actifs. La confrontation entre les prévisions théoriques et les résultats expérimentaux n'a pu encore être publiée à notre connaissance.

De nombreuses publications, pour la plupart très récentes, traitent de la fixation d'enzymes sur des particules insolubles, mais les problèmes expérimentaux et théoriques posés par cette "enzymologie hétérogène" n'y sont pas abordées.

Il faut toutefois citer RICHARDS et QUIOCHO (1964) qui ont figé par réticulation la structure cristalline de l'acetylcholinesterase et tenté de montrer l'influence de la forme physique obtenue sur la cinétique enzymatique. L'étude d'un tel système est toutefois limitée par la nécessité d'une approche théorique prenant en compte les trois dimensions des cristaux protéiques.

L'effet des catalyseurs biologiques fixés dans les structures se distingue de celui des catalyseurs libres en solution par les limitations liées aux contraintes d'approche et de diffusion des substrats et des produits des réactions se produisant dans ces supports. *Il s'en distingue également par le caractère directionnel ou vectoriel que peut introduire la structure géométrique* des supports et la disposition des catalyseurs à leur niveau.

Une condition nécessaire de réalisation de modèles simplifiés visant à l'interprétation correcte des fonctions, liée à la structuration cellulaire est une disposition spatiale définie d'enzymes sur un même support. Elle permet, par un raisonnement physico-chimique (ou probabiliste) ne faisant intervenir que des phénomènes et des molécules connus, d'expliquer

le déplacement de certaines espèces à l'inverse de ce que laisserait prévoir le gradient de concentration ou de potentiel électro-chimique. Un tel déplacement, dit encore transport actif, nécessite un apport d'énergie dont la biochimie connait les formes scalaires les plus courantes, mais dont il est nécessaire d'expliquer la transformation en un déplacement vectoriel à l'intérieur de la cellule. Le couplage de réactions enzymatiques dans un ensemble structuré peut à lui seul expliquer de tels processus, que l'on a pu qualifier de "catalyse vectorielle".

Il restait à montrer qu'un tel mécanisme était réalisable avec les réactions métaboliques décrites parmi les mécanismes réels de transport actif, et à l'expliquer en utilisant les paramètres familiers aux biochimistes. Nous nous efforçons d'apporter cette démonstration en mettant à profit la phosphorylation du glucose en présence d'hexokinase et d'ATP, puis de sa déphosphorylation par une phosphatase. Nous obtenons un phénomène *de transport du glucose contre son gradient de concentration avec consommation d'ATP*.

L'exposé expérimental et théorique de notre travail sur l'enzymologie hétérogène et les phénomènes de transport est divisé en quatre chapitres :

I - METHODES DE REALISATION DE MEMBRANES ENZYMATIQUES ET PROPRIETES DES ENZYMES RETICULEES DANS CES MEMBRANES.

II - ETUDE THEORIQUE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE ET DES FLUX DE SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ACTIVE.

III - ETUDE EXPERIMENTALE EN DIFFUSION-REACTION DE MEMBRANES PORTEUSES D'ENZYME. MODELES DE REGULATION.

IV - ETUDE DE MEMBRANES HOMOGENES ET STRUCTUREES PORTEUSES D'ENZYMES SEQUENTIELLES. MODELES DE TRANSPORT

C H A P I T R E I

METHODES DE REALISATION DE MEMBRANES ENZYMATIQUES

ET PROPRIETES DES ENZYMES RETICULEES DANS CES MEMBRANES

Dès 1949, MICHEEL et EWERS avaient abordé avec succès la fixation de protéines inactives sur des supports insolubles. Les enzymes par contre semblaient perdre systématiquement leur activité catalytique après avoir subi une réaction chimique. A l'origine de ce travail, seules quelques publications faisaient état d'essai pour obtenir des enzymes actives après insolubilisation. Au cours des deux dernières années, le nombre de tentatives dans ce sens s'est accru considérablement. Une revue bibliographique sur ce sujet est présentée dans ce chapitre. Les méthodes décrites ne permettent généralement que la conservation d'une faible partie de l'activité enzymatique après insolubilisation. Il en résulte que les enzymes fixées avec un rendement acceptable par ces méthodes sont toutes très résistantes ; il s'agit surtout d'hydrolases, difficilement utilisables pour élaborer des modèles. Nous avons mis au point et nous présentons dans ce chapitre des techniques qui ont permis de mieux résoudre ce problème qui était fondamental pour la suite de notre travail. La liste des différentes enzymes fixées est présentée et leurs propriétés après fixation décrites.

I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ENZYMES INSOLUBILISEES

(Cette revue n'inclue pas les techniques élaborées par notre équipe, car elles seront présentées plus longuement dans la suite de ce chapitre).

La bibliographie a fait apparaître quatre grands groupes de méthodes :

- Adsorption physique,

- Inclusion,

- Fixation par liaison covalente entre l'enzyme et le support,

-Réticulation des enzymes à l'intérieur ou adsorbées sur un support.

A - Adsorption physique

TOSA et al. (1967), BARNETT et BULL (1959) ont obtenu l'adsorption de molécules enzymatiques sur des supports inertes ou des résines échangeuses d'ions. Mais cette fixation n'est valable que pour des conditions expérimentales limitées ; de faibles modifications de conditions chimiques ou physiques : variation du pH, de la température, de concentration du produit ou du substrat par exemple, peuvent provoquer une libération des molécules enzymatiques. Cette méthode semble avoir été écartée par la plupart des auteurs du fait qu'elle ne permet qu'une fixation passagère.

B - Inclusion

BERNFELD et al. (1963, 1968, 1969, 1970) ont étudié la fixation d'enzymes par inclusion dans des supports hydro-insolubles. Ils introduisent des protéines dans un gel, puis réticulent fortement celui-ci afin de les emprisonner. Ce procédé permet d'obtenir une répartition homogène de l'enzyme à l'intérieur du support mais il a deux inconvénients : les agents de réticulation employés jusqu'ici altèrent considérablement l'activité de l'enzyme ; le pontage doit être dense pour empêcher la fuite de la protéine, ce qui gêne la pénétration du substrat.

GUILBAUT et al. (1969, 1970) ont repris cette méthode pour certaines applications analytiques, la réalisation d'électrodes à enzymes, en particulier. Les résultats publiés semblent prometteurs, mais paraissent n'avoir été l'objet que d'une exploration préliminaire.

C - Liaison covalente entre l'enzyme et le support

Les méthodes de ce type ont donné lieu à de nombreuses tentatives. Les enzymes fixées sont presque exclusivement des hydrolases. Ces techniques peuvent être classées suivant la

nature de la fonction réactive portée sur le support.

Méthodes utilisant les azides :

Les fonctions azides sont portées par la cellulose et réagissent avec les fonctions amines des protéines. La première tentative connue (MICHEEL et EWERS, 1949) utilise cette méthode pour fixer des protéines inactives. MITZ et SUMMARIA (1961) ont modifié la méthode originale pour pouvoir garder des traces d'activité enzymatique. Une équipe anglaise a repris cette dernière, en vue de son extension à des applications dans le domaine de l'engineering biologique (CROOK 1968, HORNBY et al. 1966, WHARTON et al. 1968, LILLY et al. 1966).

Méthodes utilisant les dérivés triaziniques :

La cellulose est également le support dans cette méthode (KAY et CROOK 1967, SUVINOR et MANOILOR 1966). Quelques hydrolases ont été fixées efficacement par SELF et al. (1969), WILSON et al. (1969), SHARP et al. (1969), KAY G. et al. (1970). La fixation décrite par WILSON et al. (1968) de la lactate deshydrogénase, avec une conservation de *0,01 %* de l'activité après fixation, doit être interprétée avec prudence, car un rendement aussi faible n'est pas significatif.

Méthodes utilisant le bromure de cyanogène :

Dans cette méthode, mise au point en Suède (PORATH et al.1967, AXEN et al. 1969, 1970), le support n'est plus la cellulose mais un polysaccharide. Le premier utilisé fut le sépharose qui a l'avantage d'assurer une bonne pénétration des substrats. GREEN et CRUTCHFIELD (1969) ont décrit la fixation de l'alphachymotrypsine sur l'agarose par cette méthode.

Méthodes utilisant la bromacétyl-cellulose comme support :

JAGENDORF et al. (1963), RABBINS et al. (1967) ont mis cette méthode au point en vue d'applications immunologiques. Elle permet la fixation d'enzymes résistantes à la dénaturation.

Méthodes utilisant des copolymères comme supports :

RIESEL et KATCHALSKI (1964), BAR-ELI et KATCHALSKI (1963), GOLSTEIN et al. (1964) ont utilisé un copolymère d'acide malique et d'éthylène pour insolubiliser la trypsine. WAGNER et al. (1968) ont employé un copolymère de L-alanine et de L-acide glutamique pour fixer la même enzyme.

Méthode utilisant le verre comme support :

WEETALL (1969_a, 1969_b), WEETAL et HERSH (1969) ont fixé la trypsine et la papaine sur du verre porteur de silane. Dans cette méthode, il semblerait que la fixation se fasse par adsorption et non par liaison covalente, une certaine libération des molécules enzymatiques étant observée.

Toutes les méthodes précédentes ont sensiblement les mêmes qualités et les mêmes défauts. Par liaison covalente directe, *les enzymes restent parfaitement solidaires du support*, dans les conditions biologiques. *Mais leurs applications sont limitées par le faible rendement enzymatique de la fixation*. La proximité de l'enzyme et du support semble être la cause de la diminution considérable de l'activité dûe au greffage. De plus, les résultats obtenus semblent n'être que rarement reproductibles.

D - RETICULATION DES ENZYMES A L'INTERIEUR OU ADSORBEES SUR UN SUPPORT

GOLDMAN et al. (1965) fixent la papaïne dans un support de collodion par pontage de l'enzyme par l'acide bis-diazobenzidine 3-3' disulfonique. Cette méthode présente l'avantage de conserver une part beaucoup plus grande de l'activité de l'enzyme. Les molécules actives pénètrent à l'intérieur du support par diffusion. Elles sont ensuite pontées entre elles par un agent bifonctionnel. Un réseau interne de protéine se forme et reste solidaire de la trame macromoléculaire du support. HAYNES et WALSH (1969) adsorbent des molécules actives sur des particules de silice colloidale, puis les pontent à l'aide d'un agent bifonctionnel.

En résumé, les nombreuses méthodes énoncées peuvent avoir *un intérêt technologique* important en insolubilisant des catalyseurs biologiques couramment utilisés en solution ; *mais l'éventail trop restreint des enzymes qui peuvent être fixées efficacement par ces méthodes ne permet pas l'élaboration de modèles biologiques*.

Nous pouvons constater que malgré le nombre des publications qui s'y rapportent, la fixation des enzymes sur supports insolubles est encore à ses débuts. Des méthodes nouvelles et plus efficaces doivent être élaborées, permettant d'élargir le spectre d'application à un plus grand nombre d'enzymes. *Le travail décrit dans la suite de ce chapitre a consisté de ce fait davantage à mettre au point de nouvelles méthodes qu'à améliorer les méthodes relevées au cours de la bibliographie*.

II - MATERIEL ET METHODES

A - METHODE DE FIXATION DES ENZYMES ET DE REALISATION DES MEMBRANES

Nous décrivons les méthodes que nous avons mises au point pour obtenir des membranes enzymatiques actives.

Les critères suivants ont été adoptés pour le choix des méthodes de fixation et celui des supports membranaires.

1. La méthode doit mettre en jeu une *réaction chimique* entre la protéine et le support, ou entre la protéine et un agent bifonctionnel *qui n'implique pas* :

-l'utilisation de températures élevées,

-l'emploi de solutions à un pH trop éloigné de la neutralité,

-la présence de réactifs susceptibles d'altérer la structure de l'enzyme,

-l'emploi de solvants non aqueux.

Ces éléments provoqueraient en effet une dénaturation de la protéine et réduiraient, ou feraient disparaitre, l'activité enzymatique.

2. Une forme de support enzymatique bien adaptée à la création de modèle doit être choisie. La forme pelliculaire ou membranaire parait avantageuse car elle permet de raisonner dans *une seule dimension*. Les calculs du modèle sont ainsi considérablement simplifiées.

3. *Le support membranaire doit posséder les caractères suivants :*

-de bonnes propriétés mécaniques dans les conditions d'étude,

-une complète inertie chimique par rapport à l'enzyme, et aux réactifs mis en jeu,

-une bonne perméabilité vis à vis des substrats et des produits de la ou des réactions enzymatiques.

Le choix du système utilisé dérive d'une sélection effectuée selon les critères précédents.

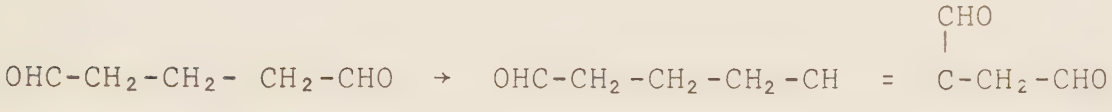
1° *PONTAGE DES MOLECULES ENZYMATIQUES A L'INTERIEUR D'UN SUPPORT*

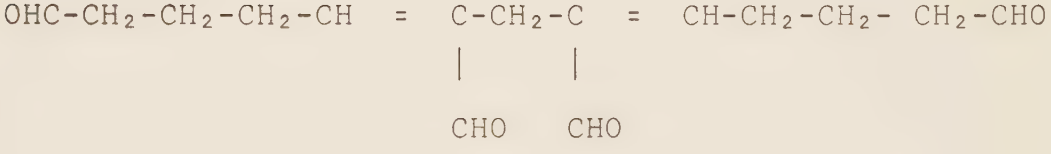
Le premier critère nous a fait opter pour une réticulation chimique des molécules protéiques à l'intérieur d'une trame macromoléculaire insoluble. Le réseau ainsi formé reste étroitement solidaire du support. Cette option implique le choix du support et du réactif bifonctionnel. La réaction chimique qu'implique l'utilisation de ce réactif doit répondre aux critères précédemment définis.

De nombreux agents de pontage ne nous ont pas donné de bons résultats. Avec un agent bifonctionnel de diazotation, l'o-dianisidine bis-diazotée, nous avons obtenu des activités résiduelles mesurables mais insuffisantes pour étayer les raisonnements sur des mesures précises. M. AVRAMEAS, du Laboratoire d'Immunologie de l'Institut de Recherche sur le Cancer de VILLEJUIF, nous a signalé les excellents résultats qu'il avait obtenus en pontant des protéines (anticorps, antigènes) avec un dialdéhyde : *le glutaraldéhyde*, réactif utilisé comme agent fixateur des protéines dans les préparations destinées à la microscopie électronique. Il est important de noter les

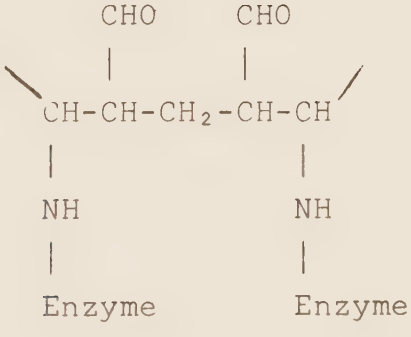
particularités de cet agent de réticulation : *le glutaraldéhyde ne semble pas agir en donnant des bases de SCHIFF avec les fonctions amines portées par la protéine*. Les produits obtenus n'ont pas, en effet, les caractéristiques de ces bases. S'appuyant sur les spectres de résonnance magnétique nucléaire (RMN), F.M. RICHARDS et KNOWLES J.R. (1968) proposent le schéma suivant qui fait intervenir une aldolisation préalable du réactif et laisse des fonctions aldéhydes libres après réticulation.

Condensation aldolique : (en l'absence de la protéine)





Après pontage :



Ainsi, l'enzyme se fixerait sur les doubles liaisons formées par la polymérisation de la glutaraldéhyde.

Dans notre équipe DOMURADO a montré récemment que les solutions de glutaraldéhyde utilisées contiennent bien des formes polymérisées qui sont sans doute responsables de la polymérisation et que le glutaraldéhyde pur est sans action.

Le support membranaire est choisi suivant les critères précédemment définis.

Nous avons obtenu des membranes actives avec le papier à chromatographie WHATMANN N° 3, le papier D.E.A.E. cellulose, des membranes d'alcool polyvinylique réticulé et des feuilles de cellophane non imprégnées de glycérol. Les papiers chromatographiques WHATMANN et de D.E.A.E. cellulose ont dû être éliminés en raison de leurs propriétés mécaniques insuffisantes dans les milieux réactionnels. Les membranes d'A.P.V. réticulé ont de bonnes propriétés mécaniques si le nombre de ponts formés est suffisant, mais les activités obtenues sont trop faibles à cause de la trop faible pénétration des protéines dans une trame membranaire trop resserrée. *C'est avec la cellophane que nous avons eu les meilleurs résultats*. Les cellophanes utilisées sont désignées par les références RHÔNE-POULENC : 550 PT 00, 300 N0, 400 N0 suivant leurs épaisseurs (55, 30 et 40 µ).

A titre d'exemple, nous donnons le mode opératoire pour la réalisation d'une membrane porteuse de glucose-oxydase. On imprégne les feuilles de cellophane d'une solution de protéine à 6 mg/ml comprenant 13 Unités I de glucose oxydase par mg, dans le tampon phosphate 0,02 M, pH 6,8. Trois ml de cette solution suffisent à recouvrir 100 cm de cellophane. On laisse alors l'eau s'évaporer à 4° C. Des activités plus importantes peuvent être obtenues en imprégnant deux ou trois fois la membrane de cette façon. Les feuilles sont recouvertes après séchage d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %, dans un tampon phosphate 0,02 M à pH 6,8. On laisse la réticulation se faire à 4°C jusqu'à ce que le solvant soit complètement évaporé. Ces membranes sont ensuite abondamment rincées par un courant d'eau distillée. Comme l'enzyme et le glutaraldéhyde possèdent un pic d'absorption à 280 nm, on fait circuler l'eau

de rinçage jusqu'à ce que son absorption devienne nulle à cette longueur d'onde.

Les fonctions libres des molécules du glutaraldéhyde engagées dans la structure insoluble sont bloquées par une solution aqueuse de glycocolle à 10 mg/ml.

On vérifie aussi l'absence d'activité enzymatique dans les dernières eaux de rinçage. Cette vérification se fait dans le cas de la glucose-oxydase avec le mélange glucose-phénazine méthosulfate M.T.T., qui donne une réaction colorée violette en présence de cette enzyme. Ce test se réalise en mettant en solution 300 mg de glucose, 20 mg de M.T.T. et 3 mg de phénazine méthosulfate dans 20 ml d'eau de rinçage. A la fin du rinçage, le test doit être négatif (Par contre, la membrane soumise à ce test se colore rapidement). Le temps global nécessaire au rinçage oscille entre trois et quatre heures ; une fois rincées, les membranes peuvent être stockées à 4°C.

2° INCLUSION DES ENZYMES DANS UN GEL APRES POLYMERISATION EN SOLUTION

Le glutaraldéhyde agit en solution sur les molécules enzymatiques en les liant les unes aux autres. Les masses moléculaires obtenues avec les enzymes testées, compte tenu de leur taux de pontage, ne sont pas suffisantes pour qu'une phase insoluble fasse son apparition. Les polymères solubles obtenus sont introduits dans une solution de monomères synthétiques de petites tailles. Ces monomères se polymérisent ensuite, enfermant dans les mailles du gel qu'ils constituent, les chaînes de protéines actives. Cette méthode originale pour insolubiliser les enzymes tient à la fois de l'inclusion et de la réticulation enzymatiques. Elle emprunte à cette dernière son respect de l'activité. De plus, elle confère une très grande homogénéité de répartition aux protéines, comme le permet l'inclusion.

Nous donnons un exemple de réalisation de membrane par cette méthode :

Ramification préalable des molécules enzymatiques en solution :

Une solution de glucose-oxydase à 6 mg/ml (13 U.I. par mg) dans le tampon phosphate 0,02 M, pH 6,8 (2,5 ml) est mélangée avec 2,5 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %. Nous laissons la polymérisation se dérouler pendant dix heures.

Réalisation d'un gel de polyacrylamide-agarose selon URIEL (1966) :

Ces gels sont coulés entre deux plaques de verre ; pour une surface de 100 cm^2 et une épaisseur de 1,5 mm, on mélange 1 ml d'une solution à 60 % d'acrylamide, et à 1,6 % de bis-acrylamide avec 5 ml de la solution enzymatique. On préchauffe ce mélange à 37°C pendant 20 mn (solution A) ; parallèlement, 96 mg d'agarose sont introduits dans 6 ml d'eau qui sont portés ensuite à l'ébullition 5 minutes. La solution ainsi obtenue est alors refroidie jusqu'à 45°C, et agitée en maintenant la température proche de 40°C (solution B). On y ajoute 5 ml de N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine, 3,6 mg de persulfate, suivis aussitôt de la solution A. Le tout est coulé entre les plaques de verre. La polymérisation se développe pendant 30 mn à l'étuve à 37°C, puis au moins 30 mn à 4°C. On démoule, puis on rince abondamment avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le bain de rinçage n'absorbe plus à 280 nm.

Si l'on fait en parallèle la même préparation, mais en introduisant dans la solution A l'enzyme non ramifiée, celle-ci se trouve complètement éluée lors du rinçage et la membrane perd toute son activité.

3° CORETICULATION ENTRE LES MOLECULES ENZYMATIQUES ET DES PROTEINES INACTIVES

Un contact prolongé entre certaines protéines et une solution de glutaraldéhyde provoque leur insolublisation par apparition d'un réseau tridimensionnel. Nous avons tenté d'obtenir des membranes par cette méthode. Après tâtonnement, nous avons pu réaliser des films avec de l'albumine plasmatique humaine. Les membranes obtenues sont transparentes et possèdent des propriétés mécaniques suffisantes pour leur utilisation expérimentale. Lors de la réticulation, nous pouvons ajouter au milieu réactionnel une ou plusieurs enzymes de notre choix. Celles-ci se répartissent statistiquement dans les chaînes macromoléculaires obtenues. Remarquons qu'il est possible, en faisant varier la quantité d'enzyme introduite dans la solution d'albumine, de modifier à la demande l'activité de la membrane par unité de surface et de volume.

A titre d'exemple nous donnons le mode de fabrication d'une membrane porteuse de galactose-oxydase :

On mélange :

-0,6 ml d'albumine plasmatique humaine à 17,5 %,

-1,1 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 6,8,

-10 mg de galactose-oxydase (par exemple),

-0,7 ml de glutaraldéhyde à 2,5 % (tampon phosphate)

Cette solution est ensuite étalée sur une plaque de verre parfaitement horizontale afin que la répartition en surface soit régulière. On laisse la réticulation s'opérer à 4°C, et au bout de 48 heures, on plonge le tout dans un bain d'eau distillée. On obtient un film qui se décolle facilement de la plaque de verre ; il est ensuite abondamment rincé

jusqu'à la disparition de l'absorption à 280 nm. Le test au M.T.T. ne révèle à aucun moment la présence d'enzyme dans les eaux de rinçage. Cette membrane peut être conservée à 4°C.

Nous ne décrivons ici que des méthodes permettant de fixer les molécules enzymatiques sur des supports membranaires. Dans notre laboratoire, des fixations au sein de particules poreuses ont également été réalisées avec succès (GELLF 1971).

B - MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les activités obtenues après fixation sont données pour plusieurs dizaines d'enzymes ; nous nous limiterons à la description des dosages d'activité de celles dont les propriétés ont fait l'objet d'une étude plus approfondie.

1° MESURE DE L'ACTIVITE GLUCOSE-OXYDASE

La glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose en présence d'oxygène moléculaire en acide gluconique, avec formation d'eau oxygénée ; la réaction est rendue irréversible par l'addition de catalase dans la membrane.

Nous en mesurons l'activité, soit en suivant la disparition du glucose, soit en mettant à profit la variation de pH provoquée par la réaction :

-dans le premier cas, on suit la disparition du substrat en faisant des prélèvements à intervalles réguliers. Le glucose est dosé par la méthode d'HYVARINEN et NIKILA (1962).

-dans le deuxième cas, la vitesse de formation d'acide gluconique est mesuré avec un "pH-stat" avec une solution de glucose (0,15 M) dans un tampon phosphate (0,005 M). Le pH choisi est maintenu constant par addition de Na OH (0,1 N).

Lors de l'énoncé des résultats, nous indiquerons pour chaque expérience le pH, la température et les conditions d'oxygénation.

2° MESURE DE L'ACTIVITE UREASIQUE

L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en carbonate d'ammonium. Nous mesurons son activité, soit en suivant l'apparition des ions ammonium, soit en utilisant l'augmentation du pH provoquée par la réaction.

On suit l'apparition du produit en faisant des prélèvements à intervalles de temps réguliers. L'ion ammonium est dosé par la méthode de BERTHELOT (1849).

La vitesse d'apparition du carbonate d'ammonium peut être mesurée par acidimétrie avec un pH-stat. On utilise une solution d'urée (0,15 M) dans un tampon phosphate (0,005 M). Le pH choisi est maintenu constant par addition de HCl (0,1 N).

Nous indiquerons le pH et la température de chaque expérience lors de l'énoncé des résultats.

3° MESURE DE L'ACTIVITE DE LA TRYPSINE

La trypsine hydrolyse certains peptides, amides, esters, etc... au niveau des liaisons comprenant les groupes carboxyliques de deux acides aminés, la L-arginine et la L-lysine. On mesure

la dégradation de l'ester éthylique de la N-benzoyl-L-arginine (BAEE). Son hydrolyse provoque l'apparition d'une absorption à 253 nm et une baisse du pH. Pour la méthode spectrophotométrique, on utilise une solution de BAEE à 350 mg/l dans un tampon phosphate 0,05 M. La vitesse d'apparition des ions H^+ est mesurée au pH-stat dans une solution de BAEE à 350 mg/l dans un tampon phosphate 0,005 M. Le pH choisi est maintenu constant par addition de Na OH 0,1 N.

4° MESURE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE

La catalase provoque la décomposition de l'eau oxygénée. Son activité est mesurée en suivant la décroissance de l'absorption de l'H_2O_2 à 240 nm. La solution d'eau oxygénée employée est 10^{-2} M dans un tampon phosphate 0,05 M. Le pH et la température de chaque expérience seront indiqués lors de l'énoncé des résultats.

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - ENZYMES FIXEES EFFICACEMENT PAR NOS METHODES ET ACTIVITE CONSERVEE APRES INSOLUBILISATION

Pour chaque enzyme, nous donnons un rendement en activité enzymatique exprimé en pourcentage :

$$\rho = \frac{\text{Activité par mg d'enzyme fixée}}{\text{Activité par mg d'enzyme en solution}} \times 100$$

Il ne s'agit pas de la mesure d'un rendement chimique mais d'une évaluation de l'activité enzymatique conservée.

Pour la méthode de réticulation de la protéine à l'intérieur d'un support, le rendement chimique est obtenu par dosage du taux d'azote après fixation. Par la méthode de coréticulation, toutes les protéines mises en jeu sont insolubilisées, le rendement chimique est donc de 100 %.

Les résultats obtenus avec les différentes enzymes testées sont regroupés tableau I. La classification courante des enzymes selon leur activité, bien que souvent arbitraire, a été adoptée dans cette présentation. *La méthode d'insolubilisation par coréticulation est de loin la meilleure*. La compétition entre les molécules actives et les molécules d'albumine a pour conséquence une liaison des enzymes par quelques fonctions amines seulement. La molécule est de ce fait très peu modifiée, les sites dénaturés sont peu nombreux et l'activité se trouve presqu'entièrement conservée.

En résumé, les molécules d'albumine forment l'armature de la structure macromoléculaire. *Les molécules actives sont*, de ce fait moins réticulées, *donc sans grande modification chimique et d'accès facile pour le substrat*. (Ajoutons à ces justifications que l'albumine est un stabilisant connu des activités enzymatiques). Le mode de préparation assure une répartition homogène des enzymes à l'intérieur du support, ce qui facilite considérablement le traitement théorique des modèles. Cette méthode, comme le montre le tableau I, permet la fixation d'enzymes réputées fragiles et permet l'accès des cofacteurs, plaçant *ainsi l'expérimentateur dans de bonnes conditions pour reconstituer en phase insoluble des séquences enzymatiques*. (La nature protéique de ces membranes permet aussi leur utilisation in vivo, en particulier à des fins thérapeutiques).

T A B L E A U I.

ENZYMES FIXEES EFFICACEMENT PAR NOS METHODES

ENZYMES FIXEES	RENDEMENT PAR LA METHODE DE RETICULATION DANS LA TRAME D'UN SUPPORT	RENDEMENT PAR LA METHODE DE CORETICULATION
OXYDO - REDUCTASES		
Glucose oxydase	10 % sur cellophane	80 % (albumine)
Urate-oxydase	5 % sur cellophane	30 % (albumine)
L-amino-acide oxydase		50 % (albumine)
Xanthine oxydase		60 % (albumine)
Catalase	5 % sur charbon actif	80 % (albumine)
Peroxydase	5 % sur papier Wathman 3	60 % (albumine)
TRANSFERASES		
Hexokinase	3 % sur papier aminé	30 % (albumine)
Ribonuclease		30 % (albumine)
ISOMERASES		
Glucose-6 phosphate isomérase		50 % (albumine)
Triose-phosphate isomérase		50 % (hémoglobine)
LYASES		
Anhydrase carbonique	5 % sur feuille siliconée	
Tyrosine décarboxylase		50 % (albumine)
Phénylalanine décarboxylase		60 % (albumine)
HYDROLASES (non limitatif)		
α-amylase	2 % sur soie	80 % (albumine)
β-galactosidase	néant (cellophane)	
Trypsine	30 % sur cellophane	
Chymotrypsine	30 % sur cellophane	
Uréase	néant	60 % (albumine)
Asparaginase		30 % (albumine)

Lorsqu'on emploie les autres méthodes d'insolubilisation, le tableau I montre que les enzymes protéolytiques résistent mieux à la fixation que les autres.

D'autre part, les masses moléculaires des enzymes ont en dehors de la nature des activités, *une influence absolue sur les rendements. Ceux-ci baissent quand la masse moléculaire s'élève et s'annulent au-delà d'un certain seuil*. L'α-amylase a dans cette optique un rendement anormalement bas vis à vis de sa masse moléculaire. Cette anomalie s'explique par la taille de son substrat l'amidon, dont l'encombrement ne permet pas le contact avec l'enzyme. Avec un support de cellophane, le rendement est nul. En fixant cette enzyme sur un support plus perméable, comme par exemple un tissu de soie, nous obtenons des rendements mesurables.

La relation entre la masse et le rendement enzymatique s'explique, d'abord par une pénétration difficile des grosses molécules enzymatiques dans le support, ensuite par des empêchements stéériques après fixation.

B - PROPRIETES DES ENZYMES FIXEES

Les résultats présentés ici ont été volontairement limités à un nombre restreint d'enzymes, pour ne pas alourdir l'exposé et pour souligner les modifications habituelles des propriétés d'une enzyme après fixation. Les propriétés abordées seront :

-la résistance aux enzymes protéolytiques,

-la résistance à la dénaturation thermique,

-l'activité en fonction de la température (dans une zone où la dénaturation est négligeable),

-l'activité en fonction du pH,

-l'affinité enzyme-substrat.

1° RESISTANCE AUX ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Nous avons soumis la glucose-oxydase libre, en solution et insolubilisée dans une membrane à l'action de la trypsine, de la chymotrypsine et d'une "pronase". L'enzyme libre est rapidement inactivée, tandis que l'enzyme fixée conserve 100 % de son activité initiale au bout de 48 heures. La divergence d'effet des enzymes protéolytiques s'explique par les difficultés qu'elles rencontrent pour accèder à leurs points d'impact quand les enzymes sont insolubilisées. Pour la trypsine, un autre mécanisme de protection s'y surajoute : cette enzyme rompt la chaîne protéique au niveau des fonctions amines libres, lesquelles sont engagées dans des liaisons chimiques lors de la réticulation dans la membrane.

2° RESISTANCE A LA DENATURATION THERMIQUE

Les résultats obtenus avec la glucose-oxydase en solution,en présence d'albumine, fixée sur la cellophane et insolubilisée par coréticulation sont présentés figure 1. Les échantillons séjournent à 55°C, puis les activités sont mesurées à 25°C pour éviter les fluctuations dûes au chevauchement de l'effet de la dénaturation et de l'énergie d'activation.

L'enzyme en solution dans un tampon se dénature très rapidement à 55°C ; cette dénaturation est ralentie par adjonction d'albumine dans le milieu.

L'enzyme fixée sur la cellophane a une dénaturation plus lente et l'activité de celle qui est insolublisée par coréticulation demeure presque inchangée. L'ensemble de ces

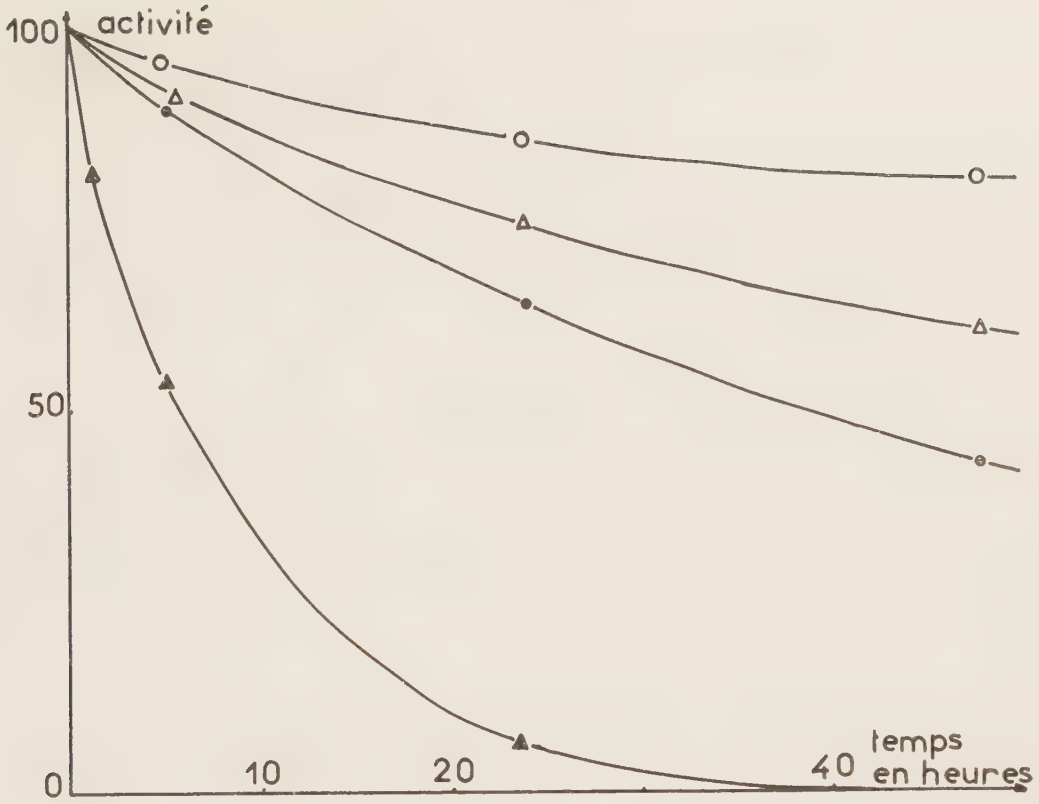


FIG. 1 : Evolution de l'activite de la glucose - oxydase a 55° C :en solution (- ▲ -), en presence d'albumine (- ● -), fixee sur une feuille de cellophane (- △ -) et dans une membrane proteique (- O -).

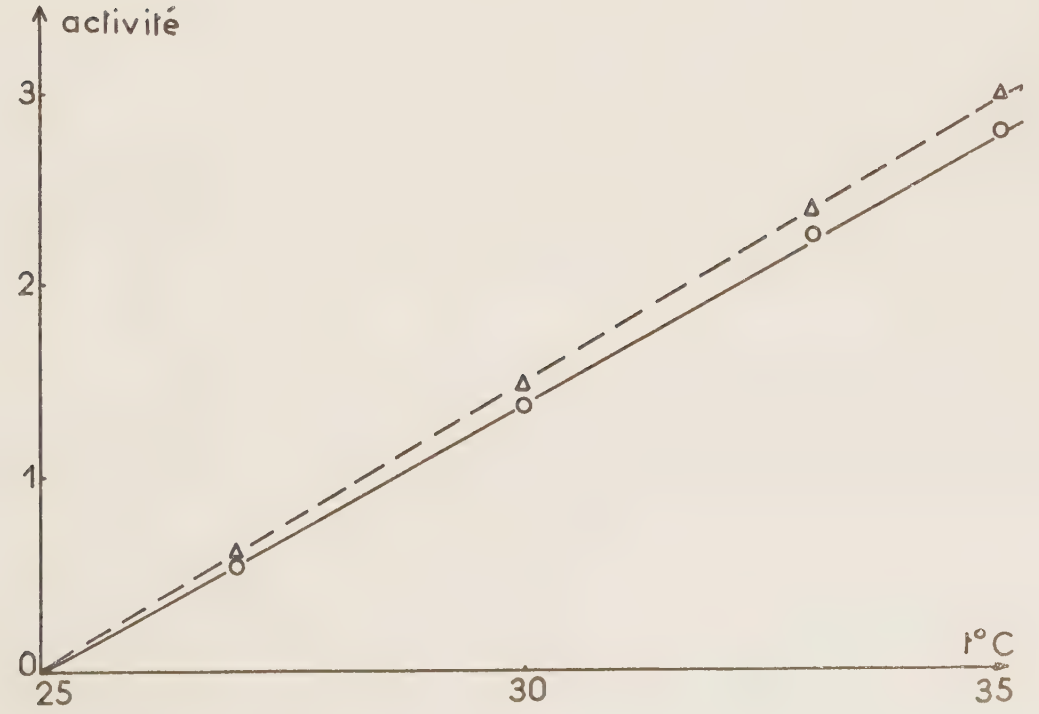


FIG. 2 : Variation de l'activite enzymatique en fonction de la temperature. Glucose - oxydase en solution (- O -) et reticulee dans une membrane (-- △ --).

constatations montre que la stabilité accrue de l'enzyme fixée est dûe à deux phénomènes :

-la réticulation stabilise la structure moléculaire de la protéine et gêne sa dénaturation. (l'enzyme sur la cellophane est plus stable qu'en solution).

-dans la membrane obtenue par coréticulation avec une protéine inactive, la concentration protéique locale très élevée a également un effet stabilisant (stabilité plus grande dans la membrane protéique que sur la cellophane pour des réticulations semblables).

3° *ENERGIE D'ACTIVATION DE LA REACTION*

Les résultats obtenus avec la glucose-oxydase sont consignés figure 2 ; il apparait qu'il n'y a pas de décalage significatif entre l'énergie d'activation des réactions homogènes et hétérogène. Il s'agit ici *d'activités maximales* avec une concentration en substrat élevée dans le milieu, pour une cinétique d'ordre zéro. Dans ces conditions, le substrat est en excès au sein du réticulum protéique et son coefficient de diffusion n'intervient pas dans la cinétique. *Nous mettons ainsi en évidence l'énergie d'activation de la cinétique enzymatique proprement dite* ; la variation du coefficient de diffusion en fonction de la température n'intervient pas dans ces mesures.

Les mesures sont faites à pH 6,5 sous barbotage d'oxygène. Nous choisissons des zones de température où la dénaturation est négligeable pendant la durée de l'expérience.

4° *pH-DEPENDANCE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE*

Les résultats consignés figures 3, 4, 5 et 6 montrent une plus grande pH-dépendance pour l'uréase, la glucose-oxydase, la trypsine, la catalase, et un décalage de maximum pour l'uréase (fig. 7). (Les mesures sont faites dans les conditions décrites dans la partie réservée aux méthodes). Ces deux phénomènes peuvent être expliqués.

Le V_{max} de la réaction enzymatique proprement dite passe par un maximum au pH optimum. Le K_M passe en même temps par un minimum. Plus le pH s'écarte du maximum, plus le K_M augmente. La valeur relative de la concentration en substrat par rapport au K_M que nous noterons $\alpha = \frac{S}{K_M}$ diminue de ce fait en tout point du système. La figure 18 du chapitre III montre que l'activité de l'enzyme insoluble est plus sensible à la baisse du coefficient α que celle de l'enzyme en solution.

En résumé, quand le système s'écarte du pH optimum, la concentration du substrat n'est plus en tout point suffisamment grande par rapport aux nouvelles valeurs du K_M pour que la cinétique hétérogène globale soit d'ordre zéro. Ce phénomène influe également sur la cinétique homogène mais d'une façon moindre. *La cinétique en phase insoluble est donc de ce fait globalement plus pH-dépendante*.

Le décalage apparent du maximum de pH que nous observons avec l'uréase et qui est également observé par GOLDMAN et coll. pour la papaïne fixée sur support de collodion (1965) est d'une autre nature. Ce glissement est provoqué par une différence entre le pH mesuré dans la solution et le pH au coeur de la phase insoluble. Le pH moyen à l'intérieur du support n'est pas le pH mesuré dans le milieu extérieur. En effet, dans les systèmes où les substrats neutres donnent des produits ionisés, l'accumulation de ceux-ci dans la

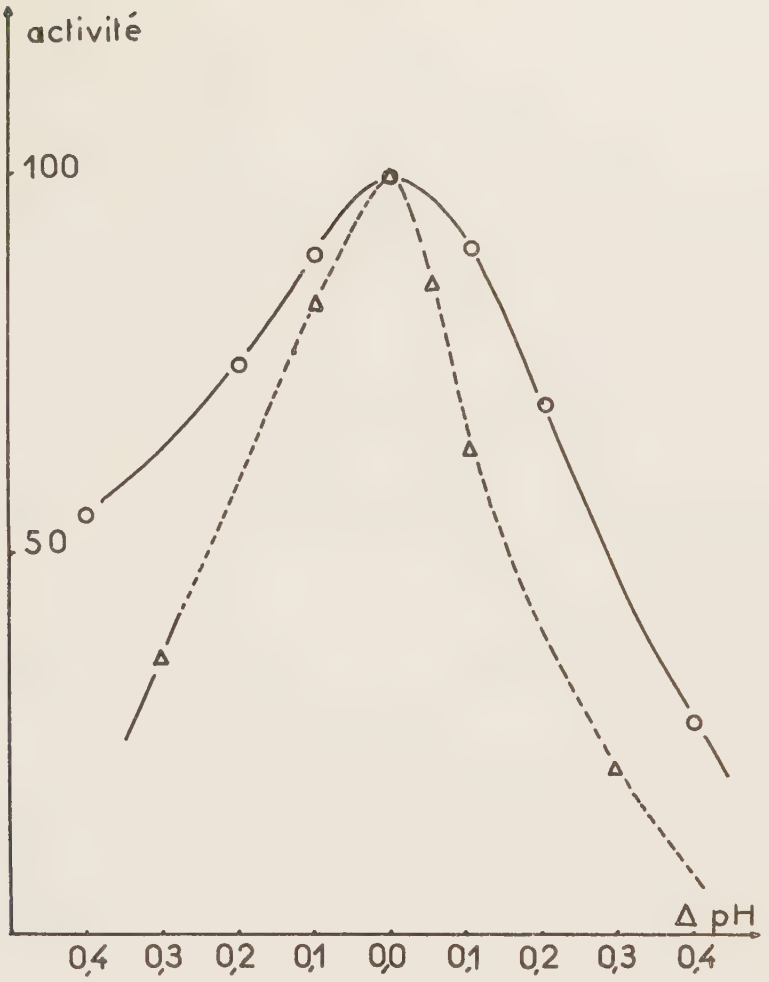


FIG. 3 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH. UREASE EN SOLUTION (- O -), ET RETICULEE DANS UNE MEMBRANE (-- Δ --), (AVEC COINCIDENCE DE L'OPTIMUM).

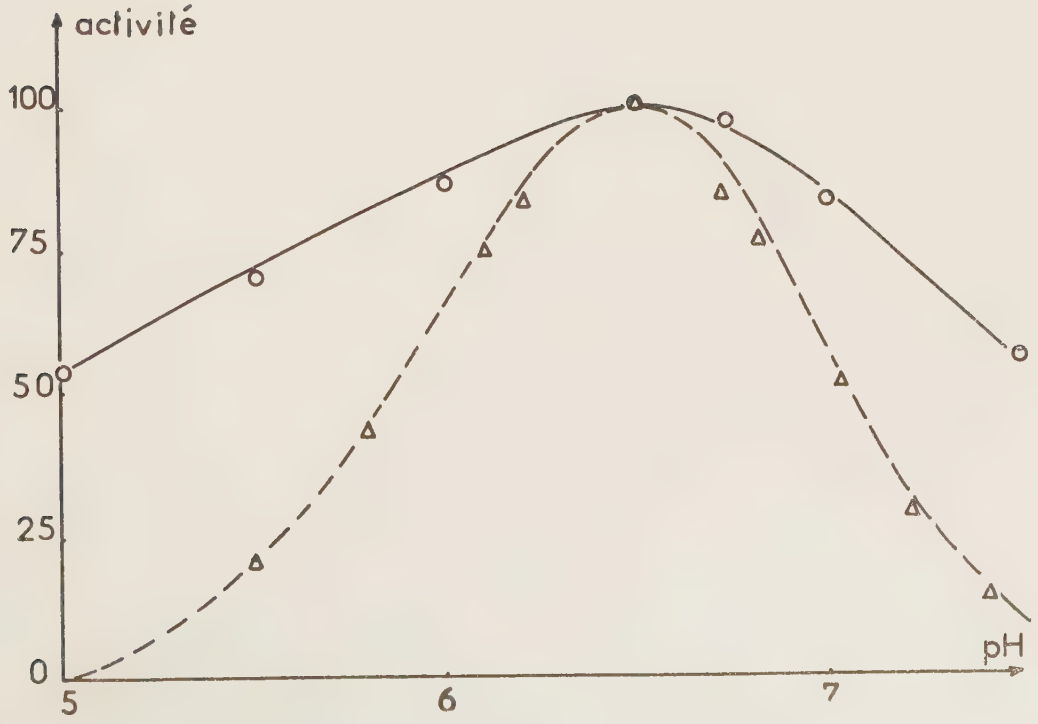


FIG. 4 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH. GLUCOSE - OXYDASE EN SOLUTION (- O -) ET RETICULEE DANS UNE MEMBRANE (-- Δ --).

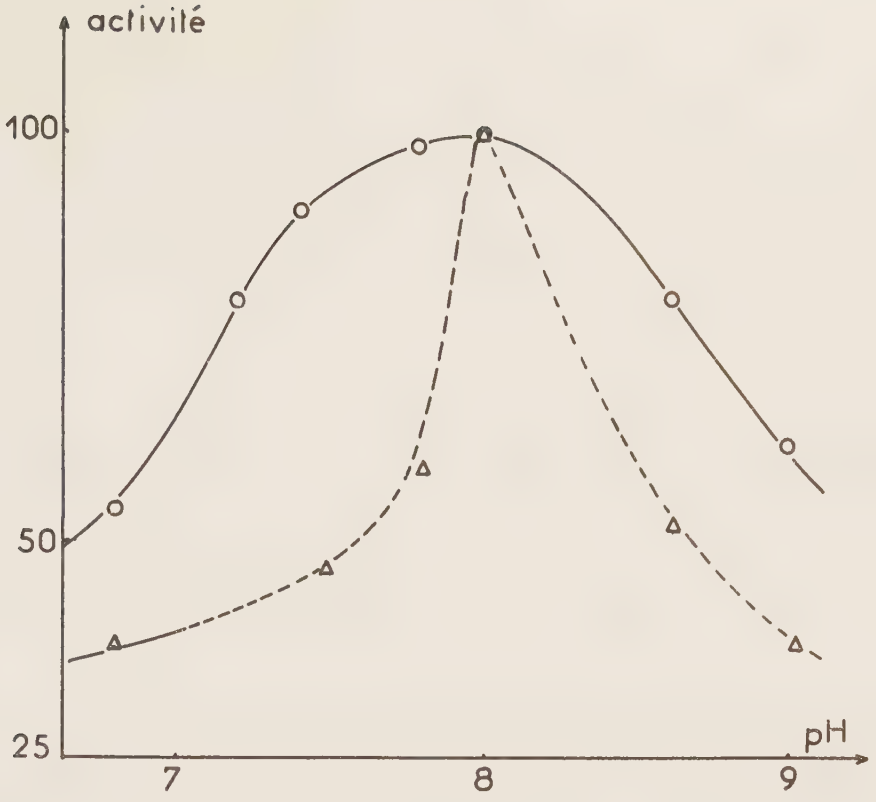


FIG. 5 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH. TRYPSINE EN SOLUTION (- O -) ET RETICULEE DANS UNE MEMBRANE (-- Δ --).

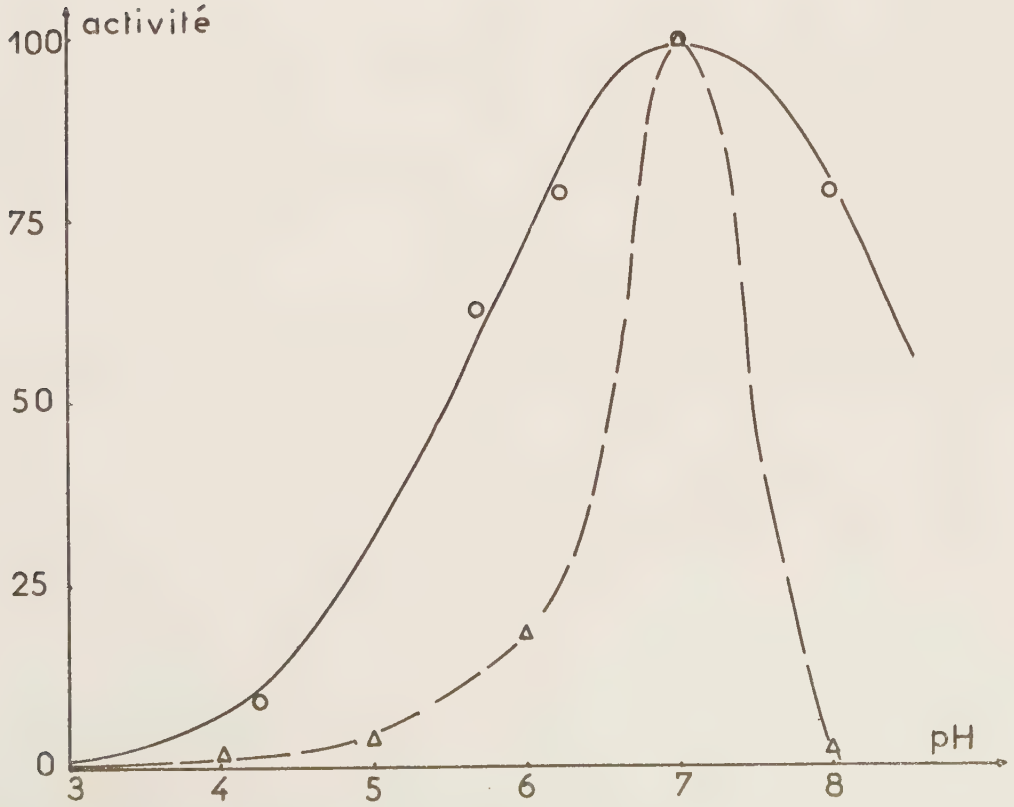


FIG. 6 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH. CATALASE EN SOLUTION (- O -) ET FIXEE SUR MEMBRANE (-- Δ --).

membrane peut faire varier le pH local dans un sens ou dans l'autre. Dans le cas de la papaïne, il s'agit d'une diminution, dans celui de l'uréase, d'une augmentation ; les pH optimum apparents se déplaceront en sens inverse. L'ampleur est liée aux coefficients de diffusion des produits ionisés, à leurs constantes de dissociation et au pouvoir tampon du milieu réactionnel.

Au cours de notre travail, nous avons *toujours* observé la pH-dépendance qui est liée à la cinétique de diffusion-réaction elle-même. Au contraire, le décalage des pH optimum n'est observé que pour certaines valeurs relatives des forces ioniques du tampon et des produits.

L'accumulation de produits ionisés dans la phase insoluble ne provoque pas de variation du pH optimal si le pouvoir tampon du milieu est suffisant.

5° *SPECIFICITE DE LA REACTION*

Nous donnons les résultats ayant trait à la spécificité de la glucose-oxydase fixée et en solution. Si la valeur 100 est donnée à l'activité de l'enzyme vis à vis du glucose, nous obtenons les valeurs relatives suivantes :

	En solution	*En phase insoluble*
GLUCOSE	*100*	*100*
D. MANNOSE	*0,98*	*1,0*
D. GALACTOSE	*0,14*	*0,15*
ARABINOSE	*0*	*0*
LACTOSE	*0*	*0*

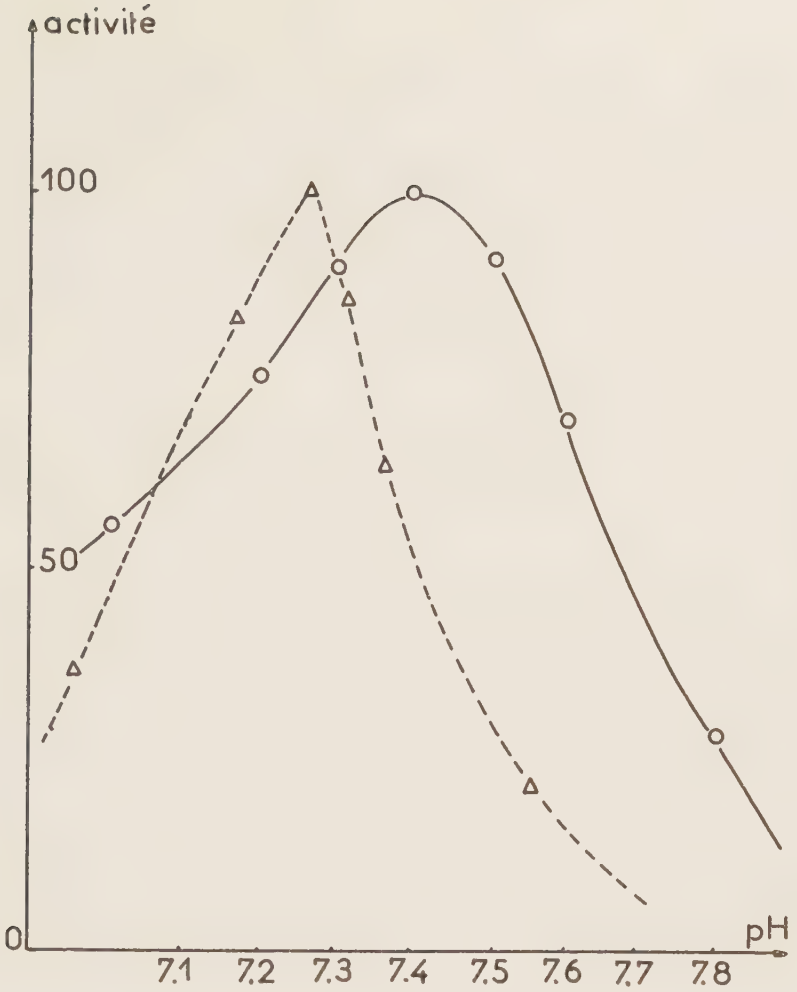


FIG. 7 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DU pH.
UREASE EN SOLUTION (- O -) ET FIXEE SUR MEMBRANE
(-- Δ --) AVEC DECALAGE DE L'OPTIMUM.

FIG. 8 : SCHEMA D'UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE HOMOGENE.

Ces résultats font penser que cette enzyme ne perd pas sa spécifité après fixation ; c'est un argument en faveur d'une absence d'altération de son site spécifique. Une règle générale ne saurait toutefois être tirée de ces observations qui demandent à être confirmées par des mesures faites sur tout un ensemble d'enzymes diversifiées.

6° AFFINITE ENZYME-SUBSTRAT

La détermination de l'affinité enzyme-substrat, donc de la constante de MICHAELIS pour les enzymes fixées nécessite des considérations théoriques sur la diffusion-réaction. Elle sera donc présentée dans le chapitre 3.

Notons ici que pour les enzymes étudiées, les constantes de MICHAELIS mesurées n'ont pas été modifiées par la fixation.

CONCLUSION

Les méthodes présentées permettent la fixation d'enzymes appartenant à toutes les classes d'activités catalytiques avec conservation d'une part importante de l'activité initiale.

Les méthodes relevées au cours de la bibliographie ne permettent que la fixation d'enzymes très robustes avec des rendements faibles en activité enzymatique.

La fixation stabilise la molécule enzymatique et de ce fait des utilisations et des applications multiples peuvent être envisagées.

Le peu de différence entre les énergies d'activation, la coïncidence du pH d'activité maximum, la conservation de la spécificité montrent que la molécule enzymatique n'est pas profondément modifiée au cours de la fixation.

La molécule active a toutefois acquis certaines caractéristiques nouvelles, en particulier une plus grande pH-dépendance de son activité.

C H A P I T R E I I

ETUDE THEORIQUE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE ET DES FLUX DE SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ACTIVE

INTRODUCTION

Nos modèles posent le problème théorique du couplage de la diffusion avec des réactions chimiques. A propos de ce couplage, KATCHALSKI (1960), KEDEM et KATCHALSKI (1961), PRIGOGINE (1955), DESIMONE et CAPLAN (1959) ont publié des modèles mathématiques et des traitements théoriques qui s'appuient sur la thermodynamique des phénomènes irréversibles. Ces travaux sont d'une importance capitale sur le plan théorique et fondamental, mais pour le couplage de la diffusion et de la réaction chimique, ils ne sont d'aucun secours pour l'expérimentateur, en particulier en biologie.

Ces calculs ne permettent pas l'obtention de résultats chiffrés. Les hypothèses implicites des équations élaborées ne peuvent donc être vérifiées par confrontation des calculs et des valeurs expérimentales obtenues avec des modèles physico-chimiques simples. Des prévisions et des explications sur le fonctionnement de systèmes plus complexes comme le sont les membranes biologiques s'avèrent ainsi impossible par cette approche.

Nous avons choisi *une approche théorique qui permet le calcul de valeurs numériques expérimentalement vérifiables* : *LE TRAITEMENT CINETIQUE*.

L'évolution des cinétiques de diffusion et réactions enzymatiques simultanées peut être formulée par des équations aux dérivées partielles non-linéaires, en fonction du temps et de la distance.

Avec l'hypothèse de l'état stationnaire, nous avons pu établir des solutions mathématiques qui rendent compte quantitativement des résultats expérimentaux. Les flux et les profils de concentration des substrats et des produits ont pu être ainsi calculés à l'état stationnaire.

Nous présentons également des solutions récentes obtenues par des méthodes d'analyse numérique sur ordinateur qui n'impliquent par l'hypothèse de l'état stationnaire. Ces méthodes permettent d'envisager la résolution d'une nouvelle génération de problèmes portant sur les possibilités de régulation et de contrôle de la diffusion-réaction. Les solutions se rapportant à l'état stationnaire ne sont en effet d'aucun secours pour ces problèmes, les systèmes régulés étant par définition évolutifs. Ces solutions ont été obtenues en collaboration avec M. KERNEVEZ, mathématicien du laboratoire du Professeur LYONS.

Dans ce chapitre, nous présentons :

-LA MISE EN EQUATION DES SYSTEMES

-LES SOLUTIONS A L'ETAT STATIONNAIRE

-LES RESULTATS OBTENUS SUR ORDINATEUR POUR LES REGIMES D'EVOLUTION

I - MISE EN EQUATION DU SYSTEME

L'étude présentée porte sur une enzyme à *substrat unique* transformée au cours d'une *réaction irréversible* dans un milieu ne contenant ni inhibiteur, ni activateur. Ce cas simple est donné à titre d'exemple. Les traitements pour des réactions plus complexes sont similaires.

A - ENZYME EN PHASE SOLUBLE (RAPPEL ET NOTATION)

Plaçons-nous d'abord dans l'hypothèse classique de MICHAELIS et MENTEN (1913), valable dans un système homogène et isotrope.

Dans la mesure où les conditions d'équilibre sont telles que l'enzyme transforme irréversiblement le substrat en produit, la réaction enzymatique se présente alors selon le schéma suivant :

$$(1) \qquad E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

E enzyme libre
S substrat
P produit

Si E_0 est la concentration en sites actifs, l'expression bien connue de la vitesse de trasnformation est :

$$(2) \qquad v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = k_2 E_0 \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

où $K_M = \dfrac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}}$ est la constante de MICHAELIS, souvent assimilée à $K_S = \dfrac{k_{-1}}{k_1}$ (si $k_{-1} >> k_2$), l'inverse de l'affinité pour le substrat.

Pour des concentrations élevées du substrat, v tend vers $k_2 E_0$ vitesse maximum V_M de la réaction.

B - ENZYME EN PHASE INSOLUBLE

L'expression de v reste toujours valable mais seulement pour un volume élémentaire donné.

Pour le raisonnement mathématique, il est toujours possible d'isoler un volume élémentaire suffisamment petit pour qu'il puisse être considéré comme homogène en concentration de substrat.

Ce raisonnement est valable quelles que soient la structure et la forme du système insoluble considéré. Ce volume élémentaire contient un nombre de molécules réelles suffisamment élevé pour que la cinétique michaelienne puisse y être employée. Ce type d'approche n'est pas valable dans les cas où le gradient de concentration est infini, mais nous sommes très éloignés de cette zone.

Globalement la cinétique michaelienne n'est plus applicable, car il n'est plus possible de donner à la concentration [S] de substrat une valeur unique à l'intérieur du support. Cette concentration varie en fonction de la position de chaque point par rapport à la structure de l'ensemble du système.

Considérons une membrane d'épaisseur e, séparant deux compartiments contenant respectivement des solutions de concentrations S_1 et S_2. Nous choisissons un axe perpendiculaire à la surface de la membrane et adoptons comme origine O, le point de contact entre la membrane et le compartiment (1) ; le sens positif va de (1) vers (2) (fig. 8).

En tout point d'abcisse x à l'intérieur de la membrane, la variation de [S] par rapport au temps : $\frac{\partial S}{\partial t}$ *est liée d'une part à l'activité enzymatique, d'autre part à sa diffusion au sein de la membrane.* Posons $S = [S]$

Ceci se traduit par l'équation différentielle :

$$(3) \qquad \frac{\partial S}{\partial t} = \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{diffusion}} + \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{réaction}}$$

Or, d'après (2) : $\left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{réaction}} = - \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}$; de même, suivant la deuxième loi de FICK :

$$(4) \qquad \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{diffusion}} = \frac{\partial}{\partial x}\left(D \frac{\partial S}{\partial x} \right) = \bar{D}^* \frac{\partial^2 S}{\partial x^2}$$

où D est le coefficient de diffusion local du substrat et $\bar{D}^*$ le coefficient de diffusion effectif moyen mesurable expérimentalement (METAYER, 1969), (3) devient alors :

$$(5) \qquad \frac{\partial S}{\partial t} = \bar{D}^* \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}$$

Une équation similaire est obtenue pour le produit de la réaction :

$$(5') \qquad \frac{\partial P}{\partial t} = \bar{D}^*_P \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{k_2 E_0 S}{K_M + S}$$

avec P = concentration en produit

$\bar{D}^*_P$ = coefficient effectif moyen du produit

Ces équations sont résolues à l'état stationnaire et en régime d'évolution.

II - SOLUTIONS A L'ETAT STATIONNAIRE (OU QUASI-STATIONNAIRE)

Nous faisons *l'hypothèse de l'état stationnaire* pour la concentration du substrat [S] ; en tout point d'abscisse x, $\frac{\partial S}{\partial t} = 0$; dans ces conditions, (5) et (5') deviennent :

$$(6)\quad \overline{D}^*_S \frac{d^2S}{dx^2} = \frac{k_2 E_0 S}{S + K_M} \quad ; \quad \text{et } (6') \quad \overline{D}^*_P \frac{d^2P}{dx^2} = - \frac{k_2 E_0 S}{S + K_M}$$

Le système est régi par une équation différentielle du second ordre non linéaire qui ne possède pas de solution analytique générale. Des solutions analytiques particulières et des solutions générales approchées peuvent être établies. (Ces solutions seront ensuite confrontées avec les résultats expérimentaux : voir Chapitre III).

Remarque : A l'état stationnaire, dans une membrane séparant des solutions ayant des concentrations en substrat et en produit égales respectivement à S_1, P_1 et S_2, P_2, les concentrations S et P ne sont pas indépendantes. La confrontation de (6) et (6') donne :

$$i)\quad \overline{D}^* \frac{d^2S}{dx^2} + \overline{D}^*_P \frac{d^2P}{dx^2} = 0$$

(i) a pour solution :

$$ii)\quad S = - \frac{\overline{D}^*_P}{\overline{D}^*_S} P + \frac{(S_2 - S_1) + \frac{\overline{D}^*_P}{\overline{D}^*_S}(P_2 - P_1)}{e} x + \left(S_1 + \frac{\overline{D}^*_P}{\overline{D}^*_S} P_1\right)$$

1° *SOLUTIONS ANALYTIQUES PARTICULIERES*

Nous pouvons obtenir pour l'équation (6) des solutions donnant les expressions des profils S (x) et des flux J (x) *dans quelques cas particuliers*.

Il est également possible d'intégrer partiellement cette équation pour obtenir $\frac{dS}{dx}$ en fonction de S. *Cette expression est d'un intérêt limité car la variable x n'y apparait pas*, elle a toutefois une grande utilité pour déterminer la constante de MICHAELIS réelle d'une enzyme dans une membrane (Chapitre III).

1. *Résolution de l'équation (6) quand [S] est grand par rapport à K_M*

Dans ce cas (6) devient :

$$\frac{d^2 S}{dx^2} = \frac{k_2 E_0}{\overline{D}^*} \qquad (7)$$

La solution est aisée ; les constantes d'intégration sont obtenues en prenant pour x et S les valeurs : x = 0, S = S_1 et x = e, S = S_2.

Nous obtenons ainsi le profil de [S] en fonction de x à l'intérieur de la membrane.

$$S = \frac{k_2 E_0}{2 \overline{D}^*} x^2 + \left(\frac{S_2 - S_1}{e} - \frac{k_2 E_0}{2 \overline{D}^*} e\right) x + S_1 \qquad (8)$$

La première loi de FICK nous donne les flux :

$$(9) \quad J = -\bar{D}^* \frac{dS}{dx} = -k_2 E_0 x + \frac{S_1 - S_2}{e} \bar{D}^* + \frac{k_2 E_0}{2} e$$

Le flux entrant est donc :

$$(10) \quad J_1 = (S_1 - S_2) \frac{\bar{D}^*}{e} + \frac{k_2 E_0}{2} e$$

et le flux sortant :

$$(11) \quad J_2 = (S_1 - S_2) \frac{\bar{D}^*}{e} - \frac{k_2 E_0}{2} e$$

Dans ces expressions, le premier terme rend compte de l'influence de la diffusion ; le second, de l'activité enzymatique.

2. *Résolution de l'équation (6) lorsque* [S] *est petit devant* K_M

L'équation (6) devient alors :

$$(12) \quad \frac{d^2S}{dx^2} = \frac{k_2 E_0}{\bar{D}^* K_M} S$$

Posons $y = S$, $\frac{d^2S}{dx^2} = y''$ et $\frac{k_2 E_0}{\bar{D}^* K_M} = a$

l'équation (12) devient :

(13) $y'' = ay$, dont la solution générale est de la forme :

(14) $$y = C_1 \, e^{x\sqrt{a}} + C_2 \, e^{-x\sqrt{a}}$$

Calculons C_1 et C_2 dans le système :

$x = 0 \qquad y_1 = C_1 + C_2$

et $x = 2\ell$ = épaisseur de la membrane

$$y_2 = C_1 \, e^{2\ell\sqrt{a}} + C_2 \, e^{-2\ell\sqrt{a}}$$

posons : $e^{2\ell\sqrt{a}} = A$ et $e^{-2\ell\sqrt{a}} = B$

(15) $$C_1 = \frac{y_2 - y_1 B}{A - B} \quad ; \quad C_2 = \frac{A y_1 - y_2}{A - B}$$

Exprimons le profil de la concentration de substrat en fonction de l'abcisse x :

(16) $$S = \frac{S_2 - S_1 B}{A - B} \, e^{x\sqrt{a}} - \frac{S_2 - A S_1}{A - B} \, e^{-x\sqrt{a}}$$

et du flux :

(17) $$J = - \bar{D}^* \sqrt{a} \left[\frac{S_2 - S_1 B}{A - B} \, e^{x\sqrt{a}} + \frac{S_2 - S_1}{A - B} \, e^{-x\sqrt{a}} \right]$$

le flux entrant :

$$J_1 = \bar{D}^* \sqrt{a} \quad \frac{S_1 \ (A + B) \ - 2 \ S_2}{A \ - \ B} \tag{18}$$

et le flux sortant :

$$J_2 = \bar{D}^* \sqrt{a} \quad \frac{2 \ S_1 - S_2 \ \ (A + B)}{A \ - \ B} \tag{19}$$

Rappelons que :

$$2\ell\sqrt{a} \ = \ e\sqrt{a} \ = \ e \ \sqrt{\frac{k_2 \ E_0}{\bar{D}^* \ K_M}}$$

Si nous faisons son équation aux dimensions :

$$L \ \sqrt{\frac{nL^{-3} \ T^{-1}}{L^2 \ T^{-1} nL^{-3}}} \ = \ 1$$

on contate que cette expression n'a pas de dimension physique

3. *Intégration partielle de l'équation (6)*

$$K_M + S \ = \ y \qquad \frac{k_2 \ E_0}{\bar{D}^*} \ = \ a \qquad \frac{d^2 \ S}{dx^2} \ = \ y''$$

l'équation (6) devient :

$$y'' \ = \ \frac{ay \ - ab}{y} \tag{20}$$

Multiplions les deux membres par la dérivée première y'. *La valeur y' = 0 devra donc être exclue dans la suite des calculs.* Le système devra être tel que les flux ne s'annulent jamais à l'intérieur de la membrane (cf profils A, fig. 9).

$$(21) \qquad yy' = a\left(y' - \frac{by'}{y}\right)$$

Intégrons et remplaçons les symboles par leur signification réelle :

$$(22) \qquad \frac{1}{2}\frac{J^2}{D^2} = \frac{k_2 E_0}{D}\left[K_M + S - K_M \operatorname{Log}(K_M + S) + C\right]$$

Rappelons que $J = -D\frac{dS}{dx}$ d'après la première loi de FICK.

Ecrivons *pour un régime stationnaire, les flux entrant* :

$$(23) \qquad J_1^2 = 2 k_2 E_0 D \left[S_1 + K_M - K_M \operatorname{Log}(S_1 + K_M) + C\right]$$

et sortant :

$$(24) \qquad J_2^2 = 2 k_2 E_0 D \left[S_2 + K_M - K_M \operatorname{Log}(S_2 + K_M) + C\right]$$

Eliminons la constante d'intégration :

$$(25) \qquad J_1^2 - J_2^2 = 2 k_2 E_0 D \left[(S_1 - S_2) - K_M \operatorname{Log}\frac{S_1 + K_M}{S_2 + K_M}\right]$$

Dans cette expression, K_M n'est relié qu'à des grandeurs mesurables ; nous présentons Chapitre III un exemple de mesure du K_M d'une enzyme fixée dans un film protéïque.

2° *RESOLUTIONS APPROCHEES DE L'EQUATION (6)*

Nous proposons deux solutions obtenues à partir de développements en série de Mac-Laurin.

La première couvre une gamme plus étendue de valeurs des paramètres du système, mais elle n'est valable que dans un système symétrique. La seconde sert plus particulièrement au traitement des systèmes asymétriques.

1. *Résolution approchée de l'équation (6) pour un système symétrique*

Dans ce cas, nous gardons le même axe des abcisses, mais nous choisissons pour origine un point équidistant des deux surfaces limitant la membrane.

Le profil de la concentration en substrat à l'intérieur de la membrane est régi pour une fonction $S = f(x)$.
Si pour $x = 0$, $S_0 = S$, nous pouvons écrire pour tous les cas où $S_0 \neq 0$, la formule du développement en série de Mac Laurin.

$$(26) \qquad S(x) = S_0 + x \left(\frac{dS}{dx}\right)_0 + \frac{x^2}{2!} \left(\frac{d^2 S}{dx^2}\right)_0 + \ldots\ldots\ldots$$

Pour des concentrations S_1 et S_2 égales de part et d'autre de la membrane, nous obtenons un système symétrique par rapport à l'origine. La concentration [S] passe donc par un minimum au centre de la membrane, pour x = 0. *En ce point la dérivée première est nulle ; il en est de même pour toutes les dérivées d'ordre impair de S par rapport à x.*

L'équation (6) nous donne la dérivée seconde, et toutes les dérivées paires.

$$(27)\quad S(x) = S_0 + \frac{x^2}{2!}\frac{k_2 E_0}{\overline{D}^*}\frac{S_0}{K_M+S_0} + \frac{x^4}{4!}\frac{k_2 E_0}{\overline{D}^{*2}}\frac{K_M}{(K_M+S_0)^2}\frac{S_0}{K_M+S_0} + \ldots\ldots$$

Faisons $x = -\ell$ et $S = S_1$ et posons :

$$\sigma' = \frac{\sigma}{4} = \frac{k_2\, E_0\, \ell^2}{K_M\, \overline{D}^*} \qquad \text{et} \qquad \alpha = \frac{S_0}{K_M}$$

σ est un paramètre sans dimension très important dont l'influence sur le fonctionnement des membranes sera analysée dans le chapitre III.

Il vient alors :

$$(28)\quad S_1 = S_0\left[1 + \frac{\sigma'}{2!\,(1+\alpha)} + \frac{\sigma'^2}{4!\,(1+\alpha)^3} + \ldots\ldots\right]$$

$$(29)\quad J_1 = S_0\,\frac{\overline{D}^*}{\ell}\left[\frac{\sigma'}{1+\alpha} + \frac{\sigma'^2}{3!\,(1+\alpha)^3} + \ldots\ldots\right]$$

Nous pouvons obtenir $J_1 = f(S_1)$ sous forme analytique, mais l'utilisation des courbes $J_1 = f(S_0)$ et $S_1 = f(S_0)$ permet d'obtenir rapidement les valeurs de cette fonction dans chaque cas particulier, une fois les courbes tracées.

L'allure de cette fonction calculée est représenté par le tracé de la figure 18 (chapitre III).

Dans la section expérimentale, nous confrontons les valeurs calculées de cette fonction avec les valeurs expérimentales. *Rappelons que le système étant symétrique, $J_1 = f(S_1)$ représente la variation de l'activité en fonction de la concentration extérieure en substrat pour une enzyme se situant dans une phase insoluble membranaire ou particulaire.*

2. *Résolution approchée de l'équation (6) en l'absence d'hypothèse sur la symétrie du système*

Nous prenons comme système de référence celui qui est défini sur la figure 8.

Un développement en série de Mac Laurin nous permet d'obtenir S (x). Dans ce cas, les dérivées impaires ne s'annulent pas mais nous pouvons les exprimer en fonction de J, le flux ($\frac{dS}{dx} = -\frac{J}{D}x$). L'équation (6) nous donne comme précédemment les dérivées à partir de l'ordre 2.

Si $S = S_1$ pour $x = 0$
et $S = S_2$ pour $x = e$

$$(30)\quad S_2 = S_1 - \frac{e}{\overline{D}^*} J_1 + \frac{e^2}{2!} \frac{V_M}{\overline{D}^*} \frac{S_1}{K_M + S_1} - \frac{e^3}{3!} \frac{V_M}{\overline{D}^{\,2}} \frac{K_M}{(K_M + S_1)^2} J_1$$

Il est plus pratique d'introduire des paramètres rationalisés sans dimensions.

$$\alpha_1 = \frac{S_1}{K_M} \qquad \sigma = \frac{e^2}{\bar{D}^*} \frac{V_M}{K_M} \qquad \beta_1 = \frac{1}{12} \sigma \frac{1}{(1 + \alpha_1)}$$

(31)

$$\rho_1 = \frac{1}{1 + 2\beta_1} \qquad \lambda_1 = \frac{\alpha_1}{1 + \alpha_1}$$

L'expression de J_1 le flux entrant est alors de la forme :

$$(32) \qquad J_1 = \bar{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} + \frac{e}{2} V_M \lambda_1 \rho_1 (1 + \beta_1)$$

Dans cette expression du flux, le premier terme est le flux de diffusion simple selon la loi de FICK, modifié par un facteur correctif qui rend compte de l'influence de la réaction. Le deuxième est l'expression du flux purement chimique avec un terme de correction dû à la diffusion.

En plaçant l'origine à l'interface entre la membrane et la solution (2), nous obtenons l'expression de J_2

$$(33) \qquad J_2 = \bar{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} \rho_2 - \frac{e}{2} V_M \lambda_2 \rho_2 (1 + \beta_2)$$

Les profils sont obtenus en remplaçant J_1 par sa valeur dans l'expression de S (x) :

$$(34) \qquad S(x) = S_1 + \frac{x}{\bar{D}^*} J_1 + \frac{x^2}{2!} \frac{V_M}{\bar{D}^*} \frac{S_1}{K_M + S_1} + \ldots\ldots$$

Les différents types de profils possibles seront présentés dans la suite de cet exposé.

Quand $|S|$ est grand par rapport à K_M :

$$\rho_1 \to 1 \qquad \lambda_1 \to 1 \qquad \beta_1 \to 0$$

et l'expression de J_1 devient :

$$(35) \qquad J_1 = \bar{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} + \frac{eV_M}{2}$$

Elle concorde parfaitement avec la relation (10) obtenue par intégration directe, dans de telles conditions de concentration

Quand $[S]$ est très petit par rapport au K_M, l'expression de J_1 se ramène aux quatre premiers termes du développement en série des fonctions exponentielles de l'expression (18), obtenue par intégration directe.

Ces conditions sont les plus défavorables pour le calcul approché. Nous pourrons donc évaluer avec des valeurs numériques l'erreur systématique introduite au cours du calcul approché, pour les systèmes étudiés.

La comparaison des deux solutions générales approchées présentées en (a) et (b) en fait apparaitre les avantages respectifs. La première donne un développement en série (27) plus convergent que la deuxième (30). Elle permet donc d'obtenir une résolution des systèmes dans lesquels σ a une valeur élevée.

Elle est bien adaptée aux systèmes symétriques, par exemple une phase insoluble baignant dans une solution homogène.

La deuxième solution permet de résoudre les problèmes posés par les systèmes asymétriques telle qu'une membrane placée entre deux solutions différentes. Elle est plus maniable et a l'avantage de donner pour les flux des expressions analytiques relativement simples. Elle sera utile pour l'approche théorique de systèmes plus complexes.

3° PROFILS A L'ETAT STATIONNAIRE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ACTIVE

Les profils tracés sur les courbes des figures 9 à 12 ont été obtenus avec les paramètres d'un *système précis* décrit dans la section expérimentale, mais *les allures de ces profils ont une signification générale*.

Nous pourrons classer les profils en quatre grands groupes, qui apparaissent à la discussion de l'expression (33) de J_2 . (Les faisceaux de profils appartenant à ces quatre groupes sont consignés respectivement sur les figures 9 à 12).

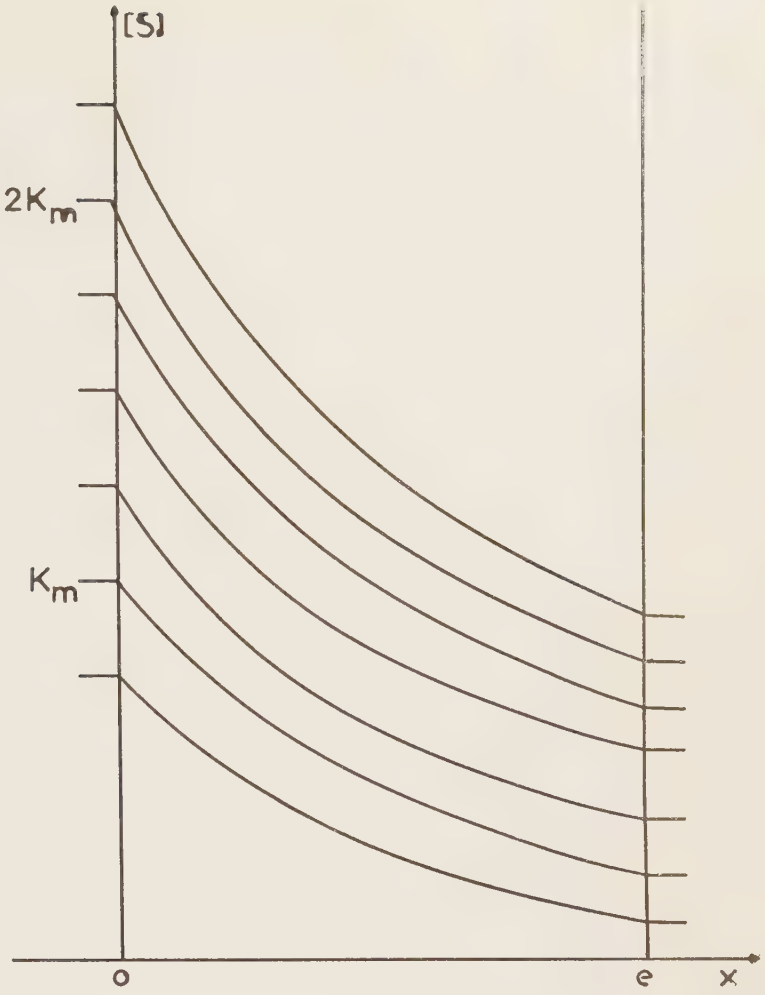
Pour la commodité de l'expression, nous noterons A, B, C et D, ces quatre groupes de profils.

GROUPE A : figure 9.

J_1 et J_2 sont tous les deux positifs.

$$(36) \qquad \overline{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} \rho_2 > \frac{e}{2} V_M \lambda_2 \rho_2 (1 + \beta_2)$$

FIG. 9 : PROFILS DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE - GROUPE A, $J_1 > 0$ ET $J_2 > 0$



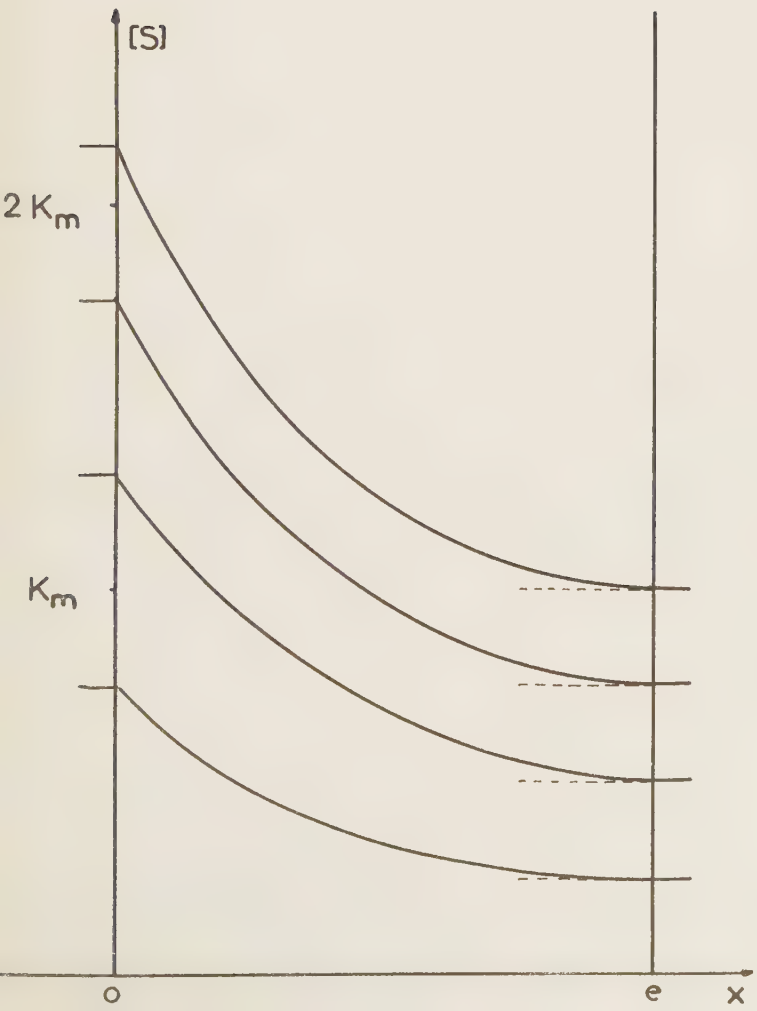


FIG. 10 : PROFILS DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE - GROUPE B, $J_1 > 0$ ET $J_2 = 0$.

La concentration S_1 diminue, S_2 augmente ; qualitativement le système évolue comme dans le cas d'une diffusion simple.

GROUPE B : figure 10.

J_1 est positif ; J_2 est nul.

$$(37) \qquad \bar{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} \rho_2 = \frac{e}{2} V_M \lambda_2 \rho_2 (1 + \beta_2)$$

Tout le substrat qui pénètre dans la membrane est intégralement et exactement transformé. La concentration S_1 tend à diminuer, S_2 par contre est stable.

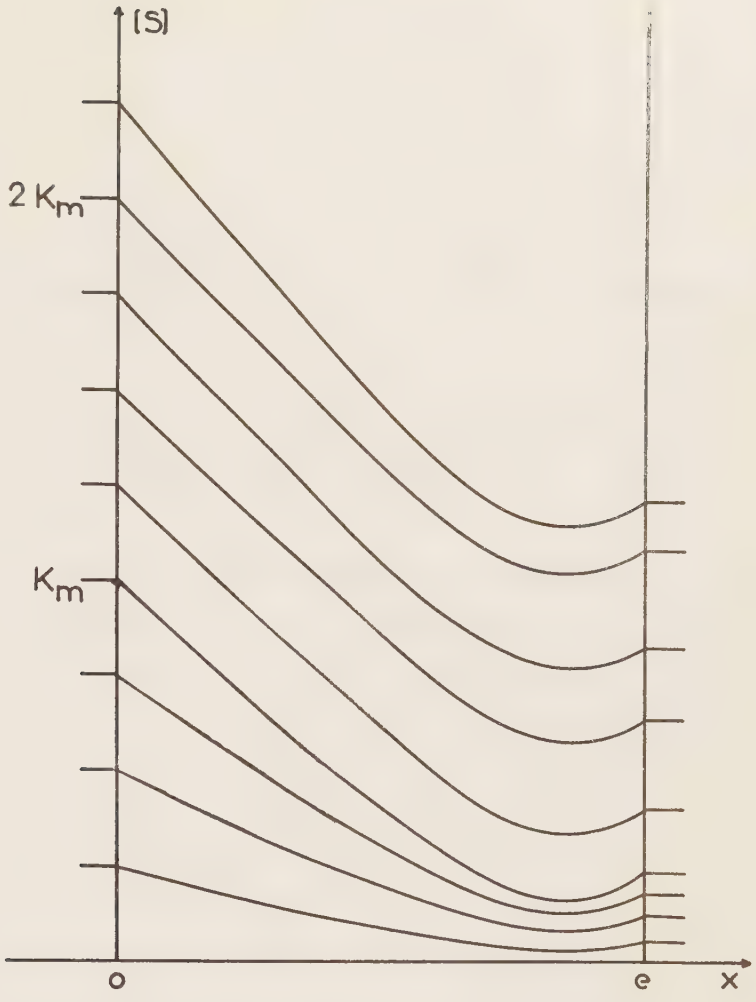
GROUPE C : figure 11.

J_1 est positif ; J_2 est négatif.

$$(38) \qquad \bar{D}^* \frac{S_1 - S_2}{e} \rho_2 < \frac{e}{2} V_M \lambda_2 \rho_2 (1 + \beta_2)$$

En effet, la concentration S_1 est supérieure à la concentration S_2 et pourtant des molécules de substrat diffusent de 2 vers l'intérieur de la membrane. *Remarquons qu'une analyse incomplète de ce type de système pourrait conduire à l'interpréter comme un "transfert actif"*. Les profils de la figure 11 *rendent bien compte de ce phénomène*.

FIG. 11 : PROFILS DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE - GROUPE C, $S_1 > S_2$, $J_1 > 0$ ET $J_2 < 0$.



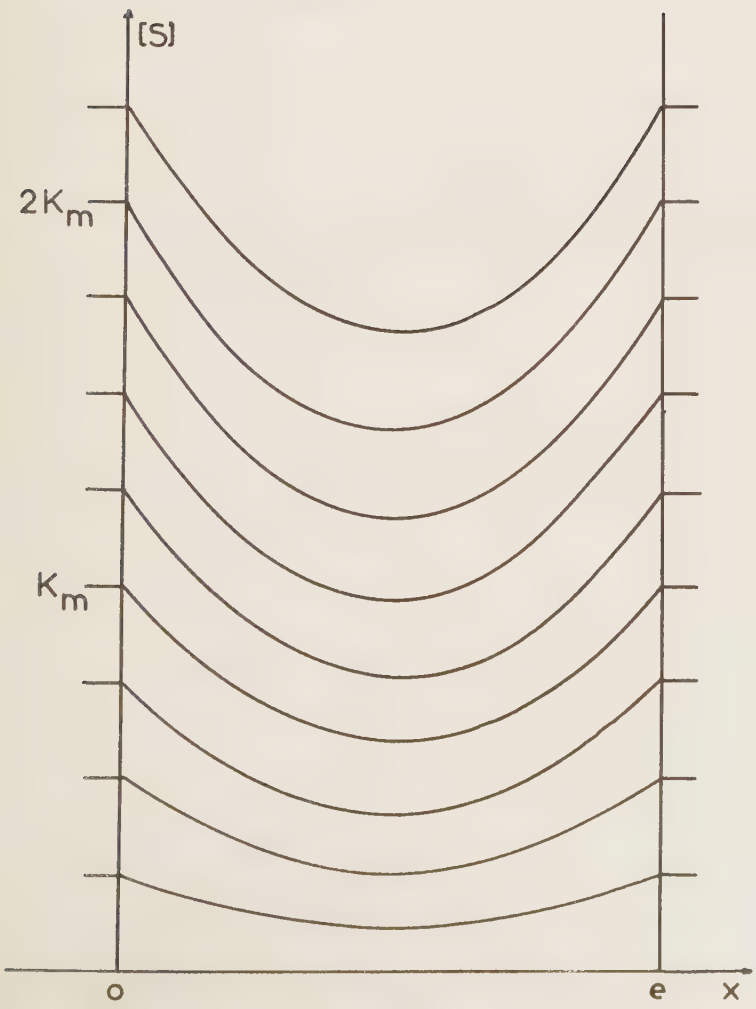


FIG. 12 : PROFILS DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE - GROUPE D, $S_1 = S_2$, $J_1 = - J_2$.

GROUPE D : figure 12.

J_1 et J_2 sont égaux en valeur absolue mais de signe contraire ; dans ce cas $S_1 = S_2$.

Le substrat pénètre dans la membrane indéfiniment, une autre forme chimique en ressort : le produit.

La "notion de profil de concentration" est d'une importance capitale pour expliquer le fonctionnement des membranes actives. Pour des systèmes plus complexes, les "profils" permettent d'analyser les phénomènes dans un langage à la fois précis et simplifié. Précis parce que prenant en compte tous les facteurs intervenant dans les systèmes, et correspondant à des valeurs numériques bien définies, à la fois pour les concentrations et les flux. Simplifié parce que permettant de mettre en évidence certains comportements qui ne sont explicables ni par les seules équations, ni par de longs commentaires (le système présenté au chapitre IV illustre ces remarques).

4° APPROCHE THEORIQUE DU COMPORTEMENT CINETIQUE D'UNE ENZYME REPARTIE D'UNE MANIERE HOMOGENE DANS UNE PARTICULE SPHERIQUE

En un point quelconque d'une masse insoluble, la variation de concentration par rapport au temps dûe à la diffusion est :

$$(39) \qquad \frac{\partial S}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left(D \frac{\partial S}{\partial x}\right) + \frac{\partial}{\partial y}\left(D \frac{\partial S}{\partial y}\right) + \frac{\partial}{\partial z}\left(D \frac{\partial S}{\partial z}\right)$$

Pour la sphère, il existe (CRANK, 1960) une équation correspondante en coordonnées polaires r, θ, ϕ, telles que :

$$(40) \qquad \begin{aligned} x &= r \sin\theta \cos\phi \\ y &= r \sin\theta \sin\phi \\ z &= r \cos\theta \quad \phi \end{aligned}$$

obtenue en considérant un volume élémentaire de côtés dr, r d θ, r sin θ d ϕ.

$$(41) \qquad \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right) = \frac{1}{r^2}\left[\frac{\partial}{\partial r}\left(Dr^2 \frac{\partial S}{\partial r}\right) + \frac{1}{\sin\theta}\frac{\partial}{\partial\theta}\left(D \sin\theta \frac{\partial S}{\partial\theta}\right) + \frac{D}{\sin^2\theta}\frac{\partial^2 S}{\partial\phi^2}\right]$$

Nous traiterons d'un système possèdant une symétrie sphèrique et dans lequel *la diffusion est purement radiale* (sphère immergée).

$$(42) \qquad \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{diffusion}} = \frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(Dr^2 \frac{\partial S}{\partial r}\right) = \bar{D}^* \left(\frac{\partial^2 S}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial S}{\partial r}\right)$$

La variation dûe à la réaction est :

$$(43) \qquad \left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{\text{réaction}} = - V_M \frac{S}{K_M + S}$$

A l'état stationnaire, ($\frac{\partial S}{\partial t} = 0$) la diffusion-réaction est régie par l'équation :

$$(44) \qquad \bar{D}^* \left(\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} \right) = V_M \frac{S}{K_M + S}$$

Posons $S = \alpha K_M$

$$(45) \qquad \frac{d^2\alpha}{dr} + \frac{2}{r} \frac{d\alpha}{dr} = \frac{V_M}{K_M \bar{D}^*} \frac{\alpha}{1 + \alpha} \qquad a = \frac{V_M}{K_M \bar{D}^*}$$

$$(46) \qquad \frac{d^2\alpha}{dr^2} = a \frac{\alpha}{1 + \alpha} - \frac{2}{r} \frac{d\alpha}{dr}$$

Toutes les dérivées peuvent être calculées en fonction de α et $\frac{d\alpha}{dr}$

Considérons la fonction $\alpha (r_1 + r)$, nous pouvons développer cette fonction *suivant la formule de Taylor* (r_1 est le rayon de la sphère).

$$(47) \qquad \alpha (r_1 + r) = \alpha_1 + r \left(\frac{d\alpha}{dr}\right)_1 + \frac{r}{2!} \left(\frac{d^2\alpha}{dr^2}\right)_1 + \frac{r^3}{3!} \left(\frac{d^3\alpha}{dr^3}\right)_1 + \ldots.$$

Dérivons cette expression par rapport à r :

$$(48)\quad \frac{d\alpha\,(r_1+r)}{dr} = \left(\frac{d\alpha}{dr}\right)_1 + r\left(\frac{d^2\alpha}{dr^2}\right)_1 + \frac{r^2}{2!}\left(\frac{d^3\alpha}{dr^3}\right)_1 + \ldots\ldots$$

Faisons $r = -r_1$ $\qquad \frac{d\alpha(0)}{dr} = 0$

(Les flux sont nuls au centre de la sphère)

$$(49)\quad 0 = \left(\frac{d\alpha}{dr}\right)_1 - r_1\left(\frac{d^2\alpha}{dr^2}\right)_1 + \frac{r_1^2}{2!}\left(\frac{d^3\alpha}{dr^3}\right)_1 + \ldots\ldots$$

$\left(\frac{d\alpha}{dr}\right)_1$ peut être obtenu en fonction de α_1

$$(50)\quad \left(\frac{d\alpha}{dr}\right)_1 = \frac{1}{3}\,ar_1\,\frac{\alpha_1}{\alpha_1+1}\left(\frac{1}{1+\frac{\sigma s}{12}\,\frac{1}{(1+\alpha_1)^2}}\right)$$

Où $\sigma_s = \dfrac{V_M\ r_1^2}{\bar{D}^*\ K_M}$ est sans unité

Expression du flux entrant du substrat :

$$(51)\quad J_1 = \frac{1}{3}\,V_M\,r_1\,\frac{\alpha_1}{\alpha_1+1}\left(\frac{1}{1+\frac{s}{12}\,\frac{1}{(1+\alpha_1)^2}}\right)$$

Vérification pour $S >> K_M$:

α_1 est très grand devant 1 ; l'activité par unité de volume est alors V_M ; pour l'ensemble de la sphère, elle est $\frac{4}{3} V_M \pi r_1^3$; d'où :

$$J_1 = \frac{\frac{4}{3} V_M \pi r_1^3}{4 \pi r_1^2} = \frac{1}{3} V_M r_1$$

En effet, à l'état stationnaire, la quantité du substrat qui disparait par réaction est égale à celle qui pénètre dans la sphère par diffusion.

Cette valeur est bien celle qui est obtenue en (51) pour J_1 , si α_1 est très grand devant 1.

Le traitement théorique du comportement cinétique d'une enzyme répartie d'une manière homogène dans un batonnet cylindrique se fait suivant une méthode analogue.

III - SOLUTIONS EN REGIME D'EVOLUTION

Nous traitons le cas d'une membrane porteuse d'une enzyme à substrat unique transformé au cours d'une réaction irréversible, dans un milieu ne contenant ni inhibiteur, ni activateur.

A - SYSTEME MONOENZYMATIQUE

Rappelons que l'équation (5) régit l'évolution de la concentration en substrat [S] dans la membrane.

$$(5)\quad \frac{\partial S}{\partial t} - D_s \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + V_M \frac{S}{K_M + S} = 0$$

Il est naturel d'utiliser *des variables sans dimension* :

$$(52)\quad \begin{aligned} x' &= x/e \qquad (0 < x' < 1) \\ t' &= t/(e^2/D_s) \qquad (0 < t' < T) \\ s &= [S]/K_M \ , \quad p = [P]/K_M \end{aligned}$$

et de poser : $\sigma = \dfrac{V_M}{K_M} \dfrac{e^2}{D_s}$

(6) devient :

$$(53)\quad \frac{\partial s}{\partial t'} - \frac{\partial^2 s}{\partial x^2} + \sigma \frac{s}{1 + s} = 0$$

Conditions aux limites :

-Bornes fixes :

$s(0,t') = s_1 \qquad s(1, t') = s_2 \qquad (s_1 \text{ et } s_2 > 0)$

-les concentrations sont maintenues constantes dans les compartiments, ou bornes mobiles (les concentrations

varient sous l'effet de la catalyse enzymatique).

$\frac{\partial s}{\partial t'}$ dans le compartiment est alors définie par :

(54) $$\frac{\partial s}{\partial t'} + \chi \frac{\partial s}{\partial n} = 0$$

où $\frac{\partial}{\partial n}$ est la dérivée normale extérieure et χ le rapport entre le volume de la membrane et le volume du compartiment.

SOLUTION NUMERIQUE SUR ORDINATEUR

Quatre méthodes différentes ont pu être utilisées pour résoudre l'équation (53) (KERNEVEZ, 1971) :

-une méthode explicite
-la méthode de Crank-Nicholson
-la méthode des 3 niveaux
-une méthode implicite

Les résultats obtenus par les différentes méthodes concordent parfaitement.

La méthode explicite est seule présentée à titre indicatif.

Dans cette méthode, tout l'intervalle d'espace (0,1) est divisé en J intervalles réguliers égaux chacun à $\Delta x'$ (donc $J \Delta x' = 1$) et l'intervalle de temps (0,T) en N intervalles égaux à $\Delta t'$ ($N\Delta t' = T$), nous écrivons :

$s(j\Delta x', n\Delta t') = s_j^n$ et nous savons que :

$s_j^o = 0$ pour $j = 1, 2, \ldots, J - 1$

et $s_o^n = s_1$ ainsi que $s_j^n = s_2$ pour $n = 0, 1, 2\ldots, N - 1$

Ces notations apparaissent figure 13_a.

Nous remplaçons dans l'équation (53)

$$\frac{\partial s}{\partial t} \quad \text{par} \quad \frac{s_j^{n+1} - s_j^n}{\Delta t}$$

et $$\frac{\partial^2 s}{\partial x^2} \quad \text{par} \quad \frac{s_{j+1}^n + s_{j-1}^n - 2\, s_j^n}{\Delta x^2}$$

L'équation aux dérivées partielles (53) devient :

$$(55) \qquad \frac{s_j^{n+1} - s_j^n}{\Delta t} = \frac{s_{j+1}^n + s_{j-1}^n - 2\, s_j^n}{\Delta x^2} - \sigma \frac{s_j^n}{1 + s_j^n}$$

Cette forme trouve des solutions par calcul numérique sur ordinateur.

La figure 13_b montre l'évolution dans le temps des profils calculés d'une membrane active contenant de la glucose-oxydase et dont les caractéristiques sont définies dans la légende. En partant d'une membrane "vide" de substrat, l'état stationnaire est atteint après 700 itérations, soit 12 secondes.

Ce temps calculé est du même ordre de grandeur que les observations expérimentales.

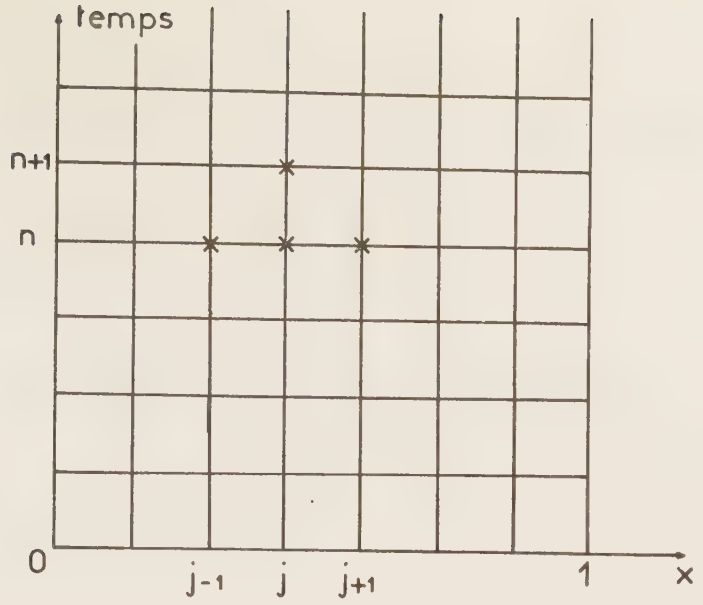


FIG. 13 $_A$: SCHEMA PRESENTANT LA SIGNIFICATION DES SYMBOLES EMPLOYES POUR LES INTERVALLES DE TEMPS ET D'ESPACE.

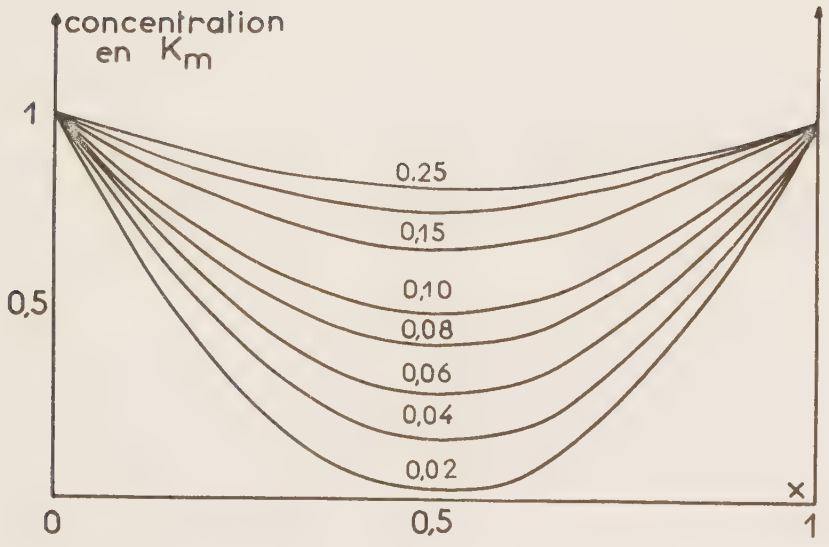


FIG. 13 $_B$: EVOLUTION CALCULEE DES PROFILS DE CONCENTRATION DU SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE CONTENANT DE LA GLUCOSE - OXYDASE.

Caractéristiques de la membrane : $\sigma = 1,4$;

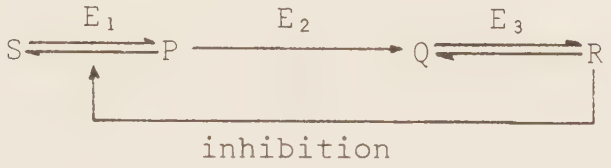
$V_m = 3,66\ 10^{-3}$ mole cm^{-3} h^{-1} ; $K_m = 1,3\ 10^{-5}$ mole cm^{-3}

$e = 0,5\ 10^{-2}$ cm ; $\overline{D}^* = 0,5\ 10^{-2}$ cm^2 h^{-1}

(unité de temps $\frac{e^2}{D^*}$)

B - SYSTEME MULTIENZYMATIQUE AVEC FEED-BACK

Les équations chimiques sont :



Chaque enzyme étant répartie uniformément dans la membrane.

Appelons V_{M_i} , K_{M_i} les vitesses maximales et les constantes de Michaelis des 3 enzymes E_i ; a_i est le rapport de la concentration du substrat sur celle du produit à l'équilibre, et b_i le rapport des K_M dans un sens et dans l'autre ;

$$\sigma_i = \frac{V_{M_i}\ e^2}{K_{M_i}\ D} \quad \text{avec } i = 1, 2, 3.$$

L'expression de V_1, vitesse de la première réaction est celle d'une cinétique enzymatique réversible avec inhibiteur compétitif

$$(56) \qquad V_1 = V_{M1}\ \frac{[S] - a_1 [P]}{K_{M1}\left(1 + \frac{R}{K_R}\right) + [S] + b_1 [P]}$$

K_R = coefficient d'inhibition de R pour E_1

On en déduit en variable réduite :

$$V_1 = \sigma_1 \frac{s - a_1 p}{1 + \frac{K_{M1}}{K_R} + s + b_1 p} \tag{57}$$

Vitesse V_2 de la seconde réaction :

$$V_2 = \sigma_2 \frac{p}{1 + p \times \frac{K_{M_1}}{K_{M_2}}} \tag{58}$$

C'est K_{M_1} qui est prise comme unité de concentration :

$$s = [S]/K_{M_1} \quad , \quad p = [P]/K_{M_1} \quad , \quad q = [Q]/K_{M_1} \tag{59}$$

$$r = [R]/K_{M_1}$$

Vitesse V_3 de la troisième réaction :

$$V_3 = \sigma_3 \frac{q - a_3 r}{1 + \frac{K_M}{K_{M_3}} q + b_3 \frac{K_{M_1}}{K_{M_3}} r} \tag{60}$$

Les équations qui régissent l'évolution du système sont :

$$\frac{\partial s}{\partial t'} - \frac{\partial^2 s}{\partial x'^2} + V_1 = 0 \tag{61}$$

$$\frac{\partial p}{\partial t'} - \frac{D_p}{D_S} \frac{\partial^2 p}{\partial x'^2} - V_1 + V_2 = 0 \tag{62}$$

$$(63) \qquad \frac{\partial q}{\partial t'} - \frac{D_Q}{D_S} \frac{\partial^2 q}{\partial x'^2} - v_2 + v_3 = 0$$

$$(64) \qquad \frac{\partial r}{\partial t'} - \frac{D_R}{D_S} \frac{\partial^2 r}{\partial x'^2} - v = 0$$

avec les conditions initiales :

$$(65) \qquad s(x',0) = p(x',0) = q(x',0) = r(x',0) = 0$$

avec pour conditions aux limites des bornes mobiles. A l'instant t' = 0 il n'y a que du substrat S dans le milieu extérieur, les concentrations de P, Q et R étant nulles.

La résolution du système d'équation est faite par la méthode explicite, en prenant dans le domaine des valeurs possibles, des valeurs numériques arbitraires :

$$\sigma = 36 \; ; \quad a = \frac{1}{2} \; ; \quad b = \frac{1}{10}$$

La figure 14_a présente l'évolution des concentrations des réactifs S, P, Q et R dans le milieu extérieur. Les courbes calculées en solution sont également présentées (figure 14_b) à titre comparatif. L'effet accru du feed-back pour le système hétérogène apparaît clairement. S décroît plus lentement et l'augmentation de la concentration des 3 autres réactifs est parallèlement plus faible.

L'évolution parallèle des flux (figure 14_d) donne des renseignements supplémentaires sur le comportement du système hétérogène.

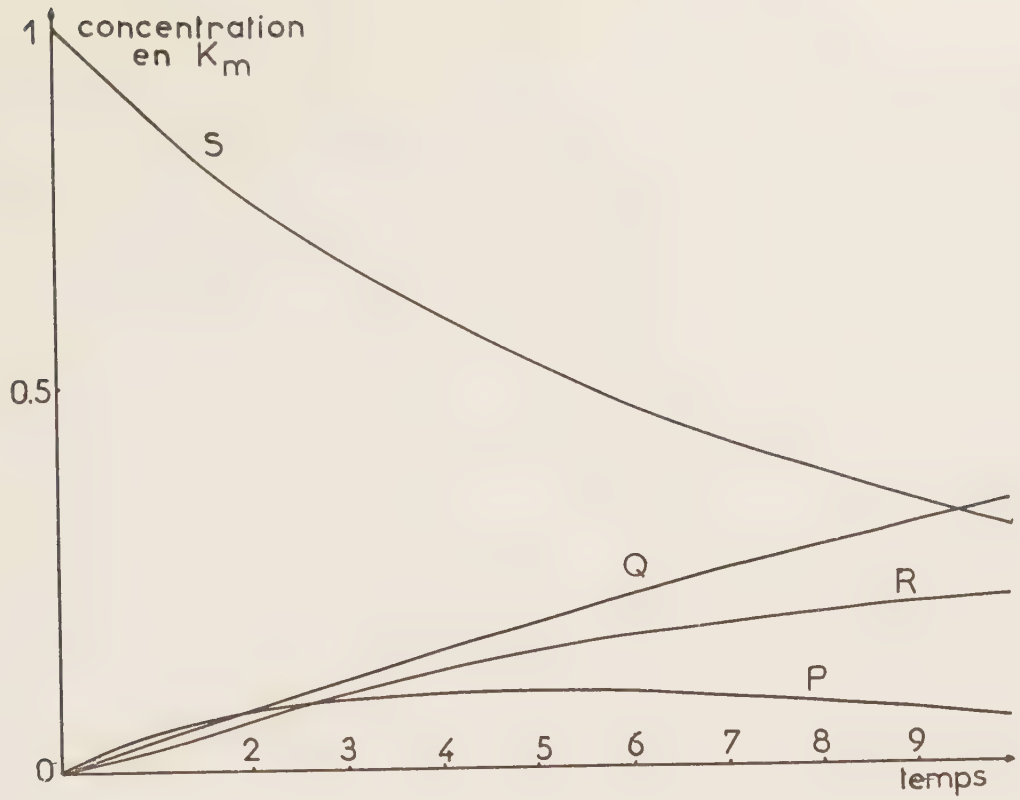


FIG. 14 $_A$: MEMBRANE IMMERGEE PORTEUSE D'UN SYSTEME MULTIENZYMATIQUE AVEC FIED-BACK EVOLUTION CALCULEE DANS LA SOLUTION DES CONCENTRATIONS DES SUBSTRATS ET DU PRODUIT FINAL : S, P, Q, R.
(unité de temps $\frac{e^2}{D^*}$)

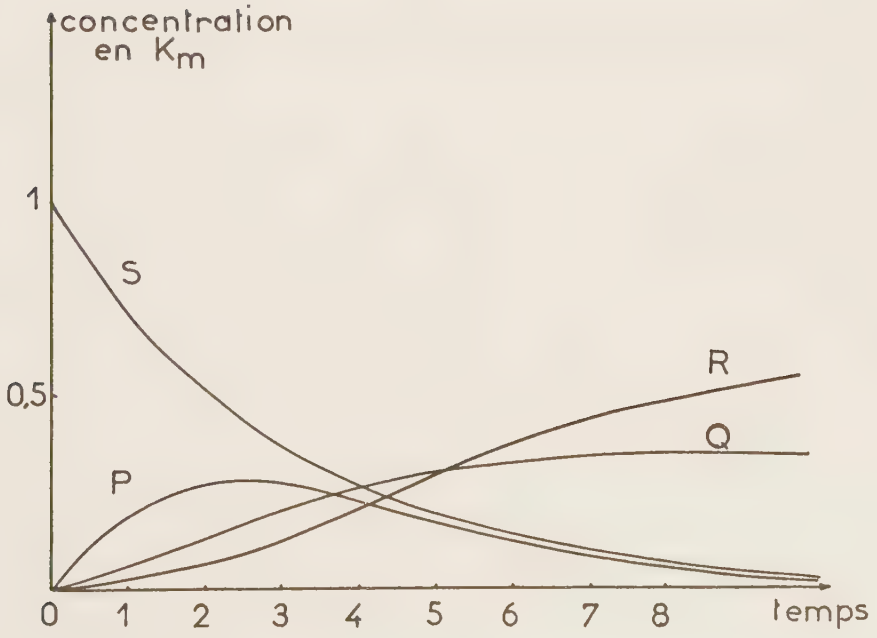


FIG. 14 $_B$: EVOLUTION CALCULEE DES CONCENTRATIONS S, P, Q ET R POUR UN SYSTEME MULTIENZYMATIQUE EN SOLUTION
(unité de temps $\frac{e^2}{D^*}$)

L'évolution des profils de P (figure 14_c) montre que le maximum observé sur la courbe de la figure 14_a est en fait la somme de phénomènes complexes. Ces profils, en mettant en évidence une accumulation intramembranaire des produits, expliquent l'effet accru de feed-back.

CONCLUSION

Le traitement cinétique permet l'approche théorique du fonctionnement de membranes porteuses d'activités enzymatiques.

L'évolution des cinétiques de diffusion et réactions enzymatiques simultanées peut être formulée par des équations aux dérivées partielles non-linéaires, en fonction du temps et de la distance.

Certaines solutions analytiques sont établies avec l'hypothèse de l'état stationnaire. Des solutions numériques sont obtenues sur ordinateur pour les régimes d'évolution

Les valeurs numériques obtenues sont expérimentalement vérifiables.

FIG. 14 $_C$: EVOLUTION CALCULEE DU PROFIL DE CONCENTRATION DU PRODUIT P DE LA PREMIERE ENZYME, A L'INTERIEUR D'UNE MEMBRANE MULTIENZYMATIQUE.

(l'unité de temps réduit est $\frac{e^2}{D^*} 10^{-3}$)

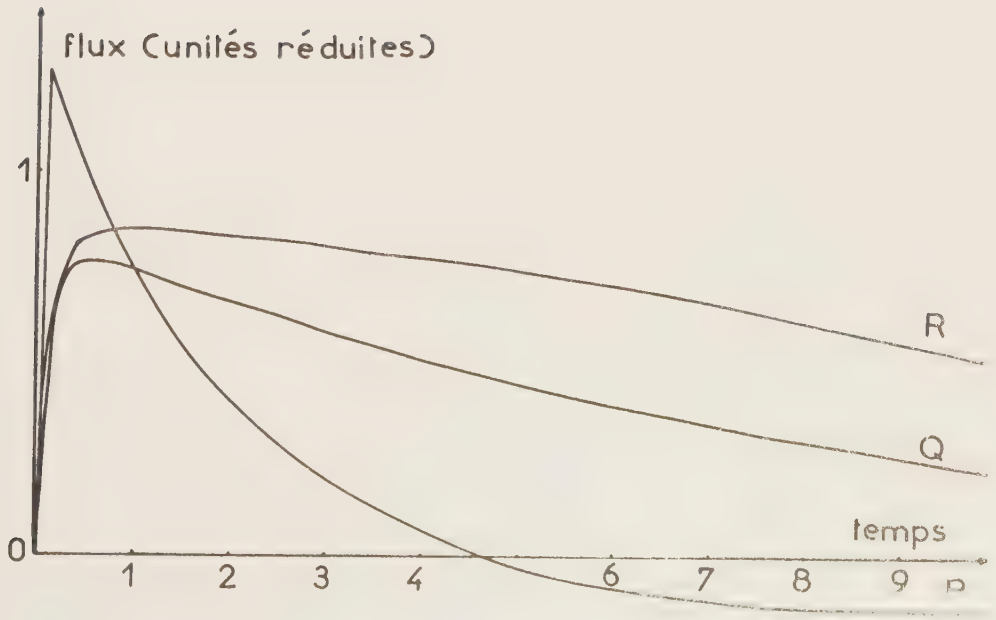


FIG. 14 $_D$: EVOLUTION CALCULEE DES FLUX DE P, Q ET R SORTANT DE LA MEMBRANE MULTIENZYMATIQUE POUR LA SIMULATION PRESENTEE FIG. 14 $_A$

(unité de temps $\frac{e^2}{D}$)

C H A P I T R E I I I

ETUDE EXPERIMENTALE EN DIFFUSION-REACTION DE MEMBRANES PORTEUSES D'ENZYMES, MODELES DE REGULATION

De nombreuses publications *théoriques* ont été consacrées au couplage des réactions chimiques et de la diffusion (cf chapitre II), mais l'approche expérimentale en est restée embryonnaire. C'est, en particulier, le cas dans le domaine de "l'enzymologie hétérogène".

La liste des enzymes liées à des membranes ou à d'autres structures cellulaires s'allonge régulièrement et M. POLONOVSKI écrivait déjà dans l'introduction d'un de ses traités:"une des limites de nos connaissances provient de ce qu'il est difficile de transposer les résultats obtenus en milieu *homogène* aux structures intracellulaires qui relèvent des lois des réactions hétérogènes".

LES BIOCHIMISTES ETUDIENT EN SOLUTION DANS UN MILIEU HOMOGENE AGITE LE COMPORTEMENT CINETIQUE D'ENZYMES QUI DANS LA CELLULE SE TROUVAIENT DANS UN MILIEU HETEROGENE ORIENTE. LES MECANISMES DE REGULATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES NE PEUVENT ETRE APPROCHES QUE TRES PARTIELLEMENT PAR CES DEMARCHES.

Nous montrons à l'aide de systèmes modèles simples que les contraintes d'accessibilité, de diffusion en particulier, peuvent moduler profondément la cinétique de la catalyse. La simple insolubilisation du catalyseur provoque une modification de ses conditions de fonctionnement telles que les lois de la cinétique enzymatique classique ne sont plus valables.

QUIOCHO et RICHARDS (1964) sont les premiers à avoir abordé le problème de "l'enzymologie hétérogène" d'une manière rigoureuse sur des systèmes bien définis. Ils réticulent l'acétylcholinestérase sous forme cristalline, et étudient son comportement cinétique immergé dans une solution de son substrat. Ce travail a toutefois été limité par la complexité présentée par cette structure cristalline à trois dimensions.

I - MATERIEL ET METHODES

A - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les modes opératoires des déterminations d'activité des enzymes étudiées dans ce chapitre ont été décrits dans les méthodes au chapitre I.

B - MESURE DES FLUX, DETERMINATION EXPERIMENTALE DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION

1° Pour étudier le comportement des membranes en diffusion et en diffusion-réaction, on utilise des dispositifs dans lesquels le film étudié sépare deux compartiments contenant des solutions de substrat.

Nous présentons ici trois types différents de ces dispositifs que nous appelerons dans la suite de l'exposé "cellules de diffusion".

Le premier type est conforme au schéma de la figure 15. Cette cellule de diffusion est en quartz, sa surface utile est de 0,49 cm^2. Elle permet de suivre directement dans chaque compartiment l'évolution de la concentration des substrats ou des produits qui possèdent une bande d'absorption en U.V.

Les figures 16 et 17 représentent des cellules de diffusion réalisées en "altuglass" ; elles possèdent des surfaces de diffusion qui sont respectivement de 50 cm^2 et 2 cm^2. Les compartiments ont des volumes de 250 et de 50 ml.

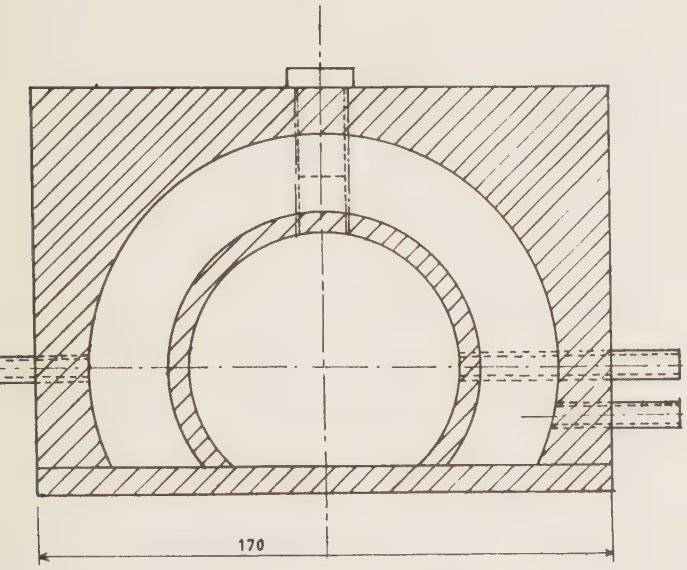


FIG. 16 : CELLULE DE DIFFUSION THERMOSTATÉE (MACRO)

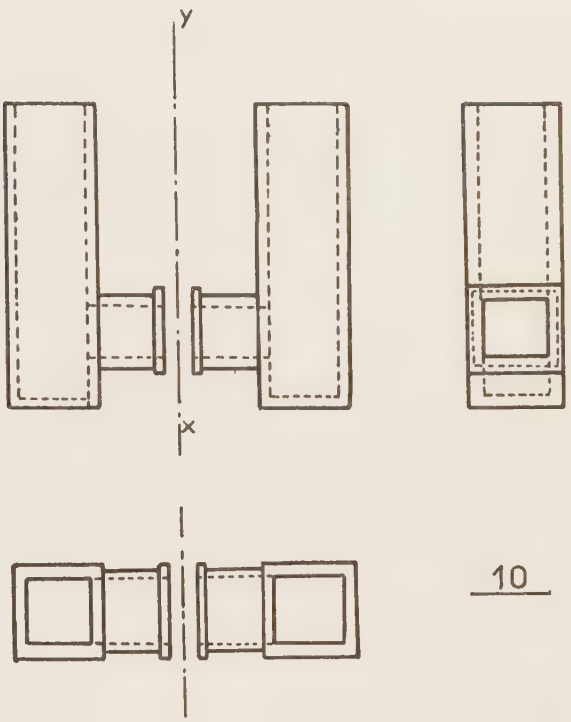


FIG. 15 : CELLULE DE DIFFUSION POUR MESURE SPECTROPHOTOMETRIQUE

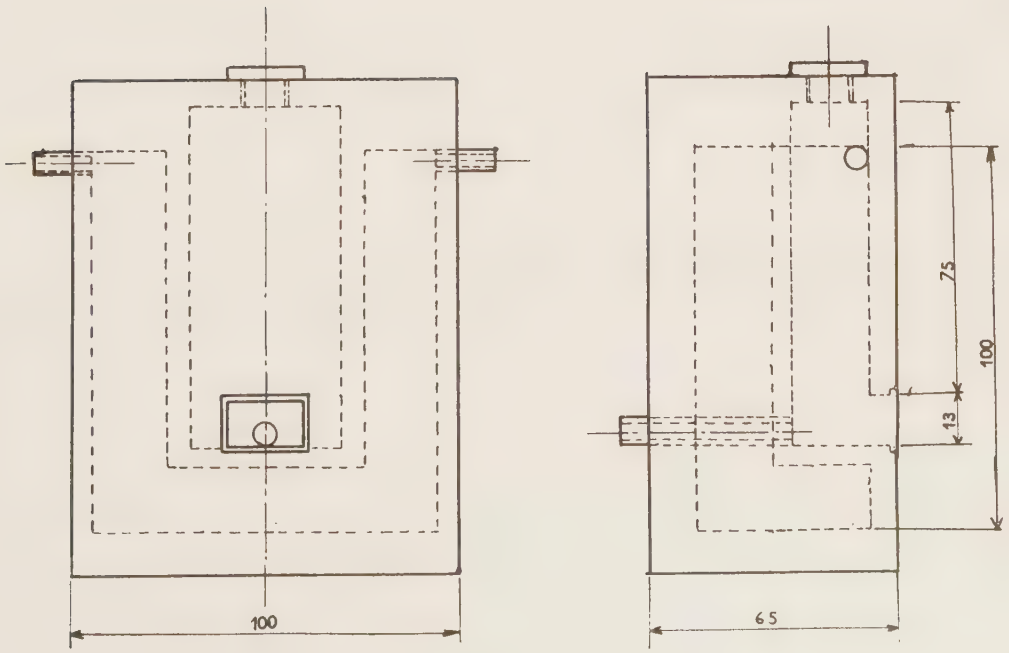


FIG. 17 : CELLULE DE DIFFUSION THERMOSTATÉE (MICI

Le brassage est assuré par agitation magnétique ou par l'intermédiaire d'un barbotage gazeux. Ces dispositifs sont entièrement thermostatés.

2° *Les flux* sont mesurés en suivant l'évolution dans le temps de la concentration des substrats ou des produits. Les coefficients de diffusion expérimentaux effectifs moyens sont obtenus après mesure des flux en diffusion simple, par application de la première loi de FICK à l'état quasi-stationnaire.

$$\bar{D}^* = \frac{Je}{\Delta C}$$

J = flux instantané
Δ C = différence de concentration
e = épaisseur de la membrane

Notons que la valeur du *flux maximum* pour des concentrations en substrat grandes par rapport au K_M, donne l'activité maximale par unité de volume membranaire.

c - MESURE DES K_M REELS DE L'ENZYME APRES RETICULATION DANS LE SUPPORT MEMBRANAIRE

Ce paramètre joue un rôle important dans nos modèles de diffusion-réaction, et c'est également une caractéristique spécifique du site enzymatique.

La cinétique Michaelienne n'est valable que pour un milieu homogène et isotrope.

Dans les systèmes membranaires, la cinétique globale ne peut être hyperbolique et michaelienne. *L'emploi des transformations linéaires de la relation de MICHAELIS dans ce cas n'a donc pas de sens*. Par ailleurs, la concentration en substrat qui correspond à la demi-activité maximum n'est pas égale au rapport $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ pour le système hétérogène (k_1, k_{-1}, k_2 ont été définis au chapitre II).

Dans la relation (25) établie dans la partie théorique, K_M n'est relié qu'à des grandeurs mesurables.

$$(25) \qquad J_1^2 - J_2^2 = 2k_2 E_0 \bar{D}^* \left[(S_1 - S_2) - K_M \operatorname{Log} \frac{S_1 + K_M}{S_2 + K_M} \right]$$

Il s'agit bien ici du K_M réel du couple enzyme-substrat à l'intérieur de la phase insoluble, paramètre qui ne concerne que la réaction enzymatique proprement dite, et ne prend pas en compte les contraintes de diffusion.

Détermination du K_M dans un système précis :

La mesure porte sur une membrane obtenue par coréticulation entre des molécules d'albumine et de glucose-oxydase.

Le système a les caractéristiques suivantes :

-température : 35°C

-pH 6,5, barbotage d'oxygène pur

-concentration en substrat en 1 et en 2

$S_1 = 1{,}25\ 10^{-5}$ moles cm^{-3}
$S_2 = 1{,}06\ 10^{-5}$ moles cm^{-3}

-flux

$J_1 = 1{,}05\ 10^{-5}$ moles $cm^{-2} h^{-1}$
$J_2 = 0{,}87\ 10^{-5}$ moles $cm^{-2} h^{-1}$

-activité maximum d'une unité de volume de membrane :

$k_2 E_0 = 3{,}66\ 10^{-3}$ moles cm^{-3} heure^{-1}

-coefficient de diffusion effectif moyen :

$\bar{D}^* = 0{,}5\ 10^{-2}$ cm^2 h^{-1} ; épaisseur e : $0{,}5\ 10^{-2}$ cm

A l'aide de la relation (25), nous obtenons la valeur du K_M réel de la glucose-oxydase après fixation.

$$K_M = 0{,}013\ M$$

Cette valeur est celle obtenue par LASER (1952) que nous avons nous-même retrouvé en solution.

L'affinité du couple enzyme-substrat ne paraît donc pas modifiée par la réaction de pontage décrite.

REMARQUES SUR LA METHODE EMPLOYEE :

La détermination des flux entrant et sortant ne nécessite que la mesure de deux variations de concentration. Nous nous plaçons dans un système tel que le profil de concentration du substrat dans la membrane appartienne au groupe A (cf fig. 9). La concentration prend dans la phase insoluble toutes les valeurs comprises entre S_1 et S_2. Les flux entrant et sortant sont porteurs d'une information très précise sur l'affinité enzyme-substrat. En effet, ils sont le résultat d'une *intégration expérimentale* qui porte sur les vitesses de réaction pour une infinité de valeurs de la concentration du substrat entre S_1 et S_2.

En conclusion, cette détermination du K_M assure une précision au moins égale à celle des méthodes, classiques en milieu homogène, s'appuyant sur des transformations linéaires de la relation de MICHAELIS. Elle a de plus l'avantage de nécessiter un nombre beaucoup plus restreint de mesures.

D - REALISATION DE MEMBRANES

Les membranes actives employées sont obtenues par les méthodes décrites au chapitre I.

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résultats expérimentaux et confrontation avec les prévisions théoriques.

Nous présentons tout d'abord des systèmes symétriques pour lesquels $S_1 = S_2$. Ces systèmes sont favorables à l'étude de la cinétique enzymatique hétérogène. De plus, le comportement d'une membrane au sein d'un système symétrique représente bien celui d'une particule immergée dans une solution de son substrat.

Des systèmes asymétriques sont ensuite présentés pour des membranes porteuses d'une seule enzyme. Cette étape est nécessaire pour élaborer des modèles structurés à enzymes séquentielles.

A - SYSTEMES SYMETRIQUES, ENZYMOLOGIE HETEROGENE ET MODELES DE REGULATION

La cinétique michaelienne classique n'est valable que pour un milieu homogène et isotrope. Pour une enzyme membranaire, aucune de ces conditions n'est satisfaite. Il nous faut donc définir une nouvelle cinétique globale tenant compte de la diffusion-réaction, à commencer par la variation de la vitesse de la catalyse en fonction de la concentration extérieure en substrat.

Nous présentons à titre d'exemple les résultats obtenus avec une membrane porteuse de glucose-oxydase.

Les membranes porteuses de catalase, dont le très grand "turnover number" et la cinétique simple (ordre 1 en solution) nous permettent de mettre clairement en évidence l'effet des contraintes de diffusion sont ensuite présentées.

Les effets régulateurs de l'insolubilisation sur une enzyme catalysant une réaction parfaitement *réversible et d'une variation de pH local* sur les cinétiques sont également décrites.

1° Présentation expérimentale de la cinétique enzymatique hétérogène

L'étude expérimentale est faite avec une membrane obtenue par coréticulation entre des molécules de glucose-oxydase et d'albumine.

Le système choisi a les caractéristiques suivantes :

$$k_2 E_0 = 3{,}66.10^{-3} \text{ moles cm}^{-3} \text{ heure}^{-1}$$

$$\bar{D}^* = 0{,}5 .10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ heure}^{-1}$$

$$e = 5 . 10^{-3} \text{ cm}$$

$$K_M = 1{,}3.10^{-5} \text{ moles cm}^{-3}$$

$$\sigma = \frac{k_2 E_0}{K_M} \frac{e^2}{\bar{D}^*} = 1{,}4$$

Les résultats expérimentaux sont figurés par des points figure 18. Nous les confrontons ainsi à la fois avec ceux de la cinétique homogène et avec le tracé théorique obtenu par l'intermédiaire des équations (28) et (29).

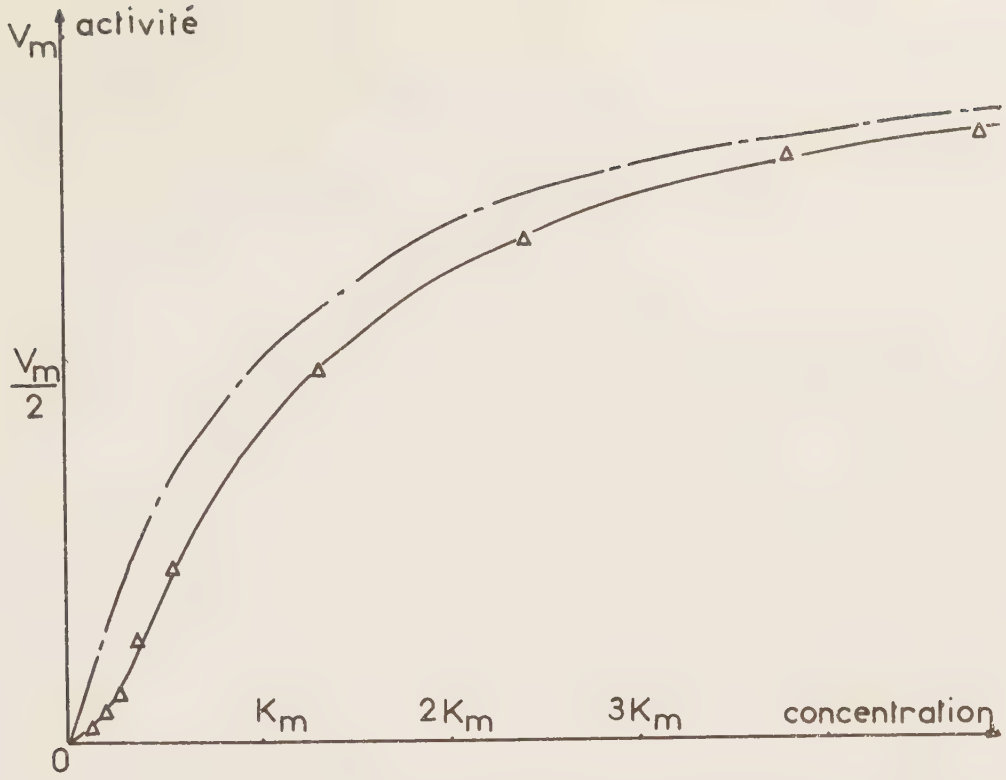


FIG. 18 : VARIATION DE L'ACTIVITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT EXPRIMEE AVEC LE K_M COMME UNITE. LES COURBES CALCULEES SONT DONNEES POUR L'ENZYME EN SOLUTION ET POUR L'ENZYME INSOLUBILISEE $\sigma = 1,4$ ⟼. LES POINTS EXPERIMENTAUX (Δ) SONT DONNES POUR UNE MEMBRANE PORTEUSE DE GLUCOSE - OXYDASE ($\sigma = 1,4$).

FIG. 19 : COURBE CALCULEE DE L'ACTIVITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT POUR UN SYSTEME OU 50 % DES ENZYMES SONT EN SOLUTION, OU SUR LA SURFACE DE LA MEMBRANE ($\sigma = 0$) ET 50 % DE LA MEME ENZYME DANS LA MEMBRANE ($\sigma = 6$).

Nous pouvons constater que :

-comme prévu, la cinétique n'est ni hyperbolique ; ni michaelienne ;

-les prévisions théoriques et les résultats expérimentaux concordent dans la limite des erreurs expérimentales ;

-la courbe a une allure sigmoïde qui rappelle la cinétique des enzymes à effet coopératif (MONOD et al. 1964). (Notons que *le tracé n'ayant pas l'équation de la courbe sigmoïde traditionnelle, le graphe en coordonnées de HILL de nos résultats n'aurait pas de signification).*

Comme il apparait à l'examen de cette courbe, ces systèmes ont un effet régulateur sur la concentration du substrat. Pour les concentrations faibles, la réaction est très ralentie par la barrière de diffusion. Il existe un seuil à partir duquel l'activité tend à atteindre la même valeur qu'en solution. Ce seuil est d'autant plus élevé et l'écart entre les concentrations internes et externes d'autant plus grand que la valeur de σ est importante. *Cette grandeur permet donc d'évaluer la part qu'introduit l'hétérogénéîté du système dans la cinétique.*

Nous pouvons analyser cette grandeur :

$$\sigma = \frac{e^2}{\overline{D}^*} \frac{V_M}{K_M}$$

qui regroupe tout ce qui freine une molécule de substrat dans sa progression vers le plan de symétrie de la membrane.

Cette expression se compose en effet de deux groupes de termes ; le premier $\frac{e^2}{\overline{D}^*}$ rend compte des contraintes de diffusion le deuxième $\frac{V_M}{K_M}$ exprime l'influence de la catalyse.

Nous remarquerons que $\frac{e^2}{\overline{D}^*}$ est directement proportionnel au "time lag" de la membrane, en diffusion simple ($L = \frac{e^2}{6\overline{D}^*}$) ; c'est à dire au "temps de perçage"des molécules en régime d'établissement.

Le rapport $\frac{V_M}{K_M}$ peut également s'écrire $k_2 E_0 \frac{1}{K_M}$ produit de la densité des sites actifs dans le support par le "turnover number" de chacun et par l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Il rend ainsi compte d'une manière simple de toutes les caractéristiques cinétiques des sites actifs ainsi que la densité de leur répartition.

En conclusion, la grandeur sans dimension σ définit entièrement une membrane active, car *elle tient compte de tous les paramètres du système*, qu'ils concernent la diffusion ou la réaction. L'évolution de l'effet régulateur en fonction de la variation des paramètres du système apparaît très clairement après la discussion du sens physico-chimique de σ .

La forme de la particule solide et la répartition des sites peut avoir un effet sur l'allure de la variation de la vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat. Des courbes semblables aux tracés calculés pour un système hétérogène et représentées sur la figure 19, ont été obtenues par certains auteurs avec des systèmes biologiques partiellement solubilisés (WINS et SHOFFENIELS, 1969)

Les profils de concentration en substrat dans un système symétrique appartiennent au groupe D (figure 12). Le profil de la concentration en produit a une forme de dôme. Le profil en substrat se creuse d'autant plus que σ est plus grand , et parallèlement la concentration en produit s'élève dans la membrane.

Les autres paramètres sont :

Epaisseur de la membrane : $e = 4.10^{-3}$ cm

$$\sigma = \frac{V_M}{K_M} \frac{e^2}{D^*} = 1440$$

pH = 7

i) Les résultats obtenus en étudiant *la cinétique de la réaction en fonction de la concentration en substrat*, en solution et avec une membrane sont consignés figure 20.

Les résultats sont du même ordre de grandeur que les prévisions théoriques, mais une valeur aussi élevée de σ ne permet pas une aussi bonne concordance que dans le cas précédent.

ii) *Utilisation de l'azide*

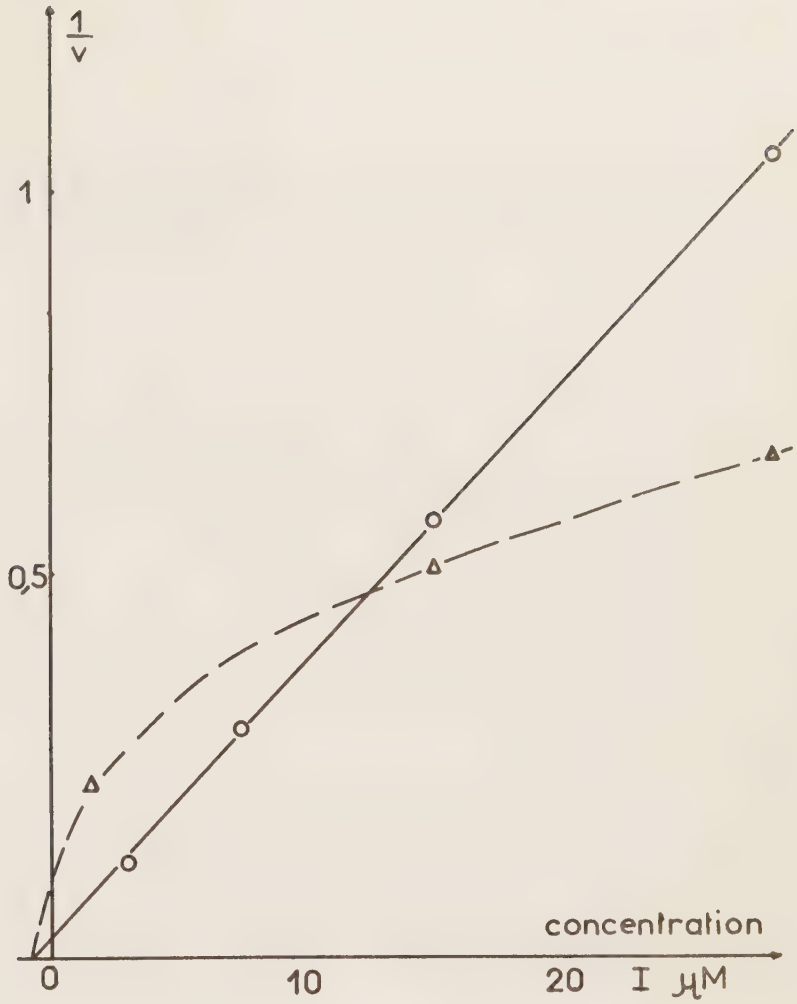
La vitesse de la réaction en solution est régie par une relation du type :

$$v = \frac{V_M}{K_M} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}} S$$

K_i : constante d'inhibition

Avec les valeurs expérimentales, le graphe de $\frac{1}{v}$ en fonction de la concentration en inhibiteur pour une valeur de S fixe donne bien une représentation linéaire (fig. 21). La valeur de K_i est obtenue par l'intersection de cette droite avec l'axe des abcisses.

FIG. 20 : INVERSE DE LA VITESSE DE REACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AZIDE POUR LA CATALASE EN SOLUTION (- O -) ET FIXEE SUR MEMBRANE (--Δ--)



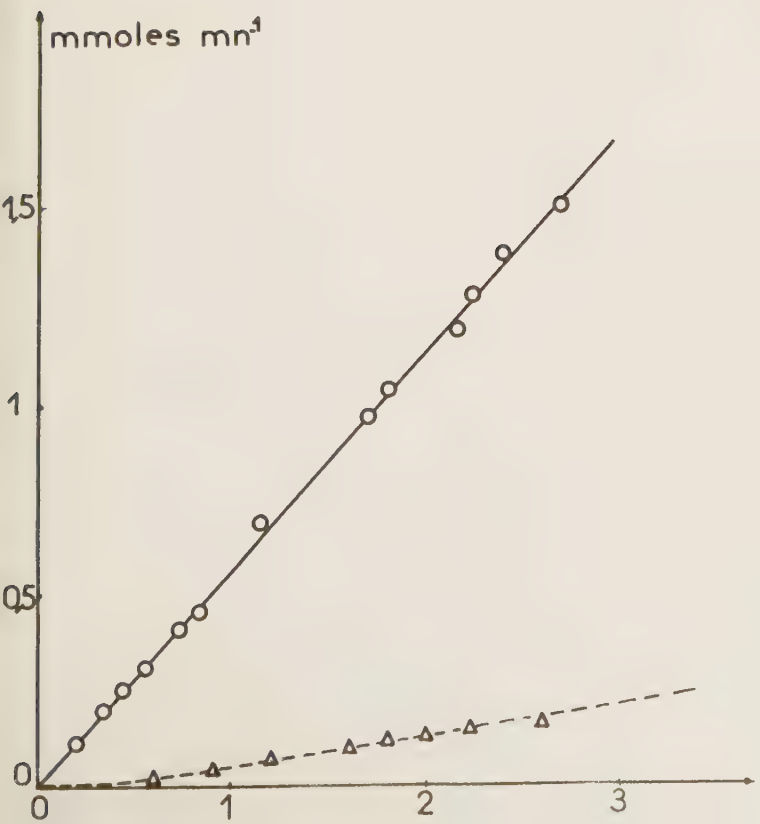


FIG. 21 : ACTIVITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EXTERIEURE EN SUBSTRAT POUR LA CATALASE EN SOLUTION (- O -) ET FIXEE (- - Δ - -).

2° *Mise en évidence des contraintes de diffusion et des profils de concentration à l'aide d'un système possédant un σ très élevé*

La catalase a un "turn over number" (k_2) élevé, qui permet l'obtention d'un σ *important avec des concentrations enzymatiques peu élevées*. Elle est inhibée selon une cinétique très précise par l'azide, et le σ peut donc être modifié pour un système membranaire donné. L'effet comparé de l'azide sur l'enzyme en solution et membranaire met en évidence les profils de concentration du substrat dans la phase insoluble.

La catalase a une cinétique d'ordre un pour une gamme de concentration en eau oxygénée relativement étendue (jusqu'à 5.10^{-2} M, fig. 20). *Elle permet un agrandissement du phénomène observé avec les autres enzymes avec de faibles valeurs de la concentration en substrat*.

Le système étudié a les caractéristiques suivantes :

Dans une zone de cinétique d'ordre 1, le paramètre de réaction est :

$$a = \frac{V_M}{K_M} = 9.10^4 \text{ heure}^{-1}$$

Le coefficient de diffusion effectif moyen de l'eau oxygénée est :

$$\overline{D}^* = 0,1.10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ heure}^{-1}$$

La même représentation pour l'enzyme membranaire donne une courbe parabolique qui montre la différence fondamentale entre les comportements cinétiques des deux formes physiques.

L'équation (18) donne la vitesse pour une réaction hétérogène d'ordre 1. Pour un σ élevé et un système symétrique, (18) devient :

$$v = 2 \frac{\overline{D}^*}{e^2} \sqrt{\sigma} \; S$$

donc avec inhibiteur :

$$v = \frac{2\overline{D}^*}{e^2} \sqrt{\frac{V_M}{K_M} \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}} \frac{e^2}{\overline{D}^*}} \; S$$

Dans cette relation K_i n'est relié qu'à des grandeurs mesurables et sa valeur peut donc être obtenue pour l'enzyme dans la masse insoluble. Les valeurs obtenues en solution et dans la membrane sont semblables, aux erreurs expérimentales près.

Nous présentons figure 22 un faisceau de courbes donnant l'activité de différents systèmes enzymatiques en fonction de la concentration en inhibiteur.

Dans ce cas, la cinétique de l'enzyme fixée est très peu sensible à l'effet de l'inhibiteur. En suivant les valeurs décroissantes de σ les courbes se rapprochent progressivement de celle qui rend compte du comportement de l'enzyme en solution. Les tests de diffusion montrent que la membrane "se remplit" de molécules d'azide en quelques secondes. Chaque volume

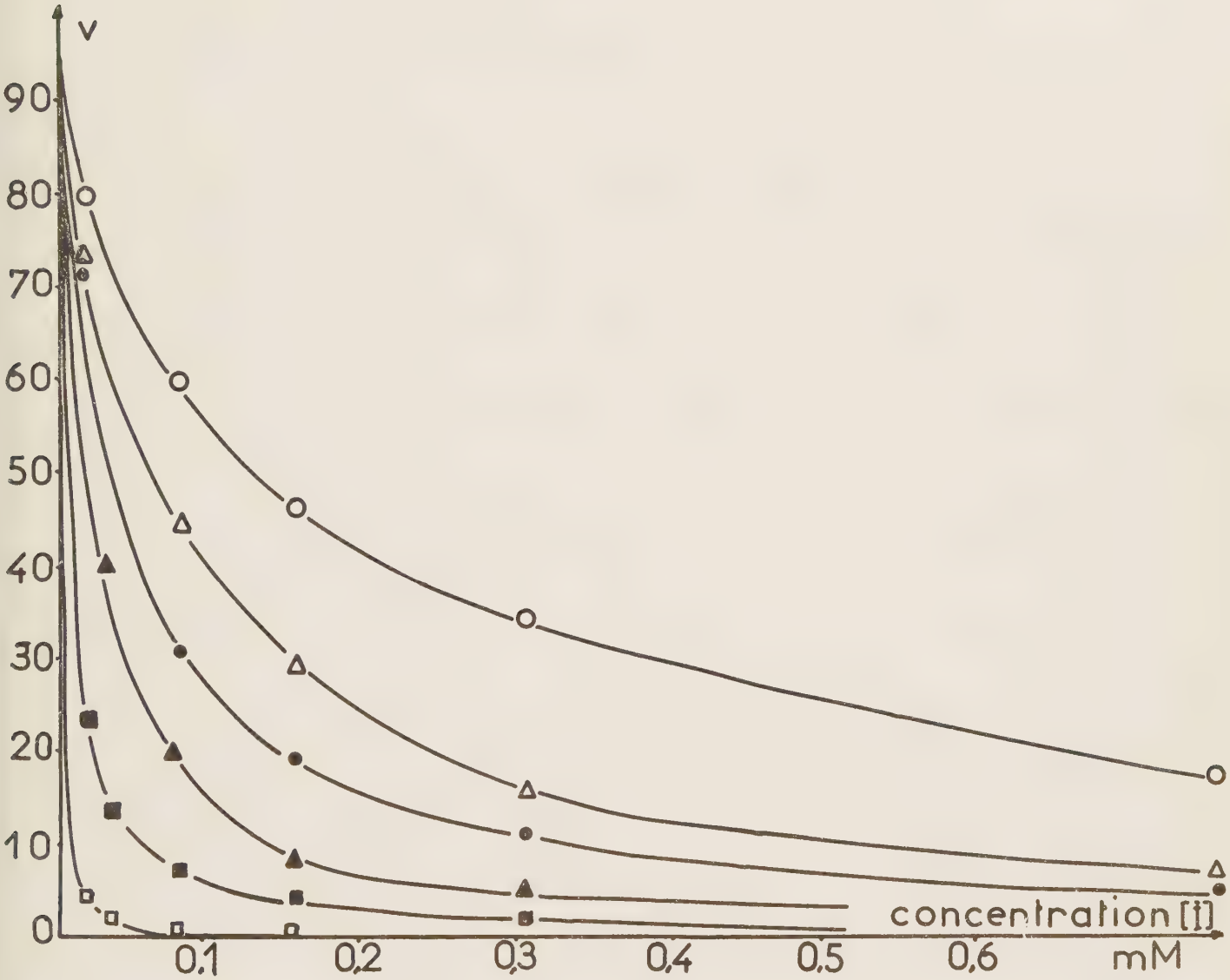


FIG. 22 : VITESSE DE LA REACTION DE LA CATALASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AZIDE POUR DES SYSTEMES POSSEDANT DIFFERENTS σ. EN SOLUTION $\sigma = 0$ (- ○ -), ET EN MEMBRANE, $\sigma = 36$ (- ■ -), $\sigma = 72$ (- ▲ -), $\sigma = 144$ (- ● -), $\sigma = 288$ (- Δ -), $\sigma = 720$ (- 0 -).

élémentaire de membrane subit donc une chute du rapport $a = \frac{V_M}{K_M}$ identique à celle qui est observée en solution. Les résultats ne peuvent donc s'expliquer que par les profils de la concentration en substrat dans la membrane.

L'introduction d'inhibiteur fait baisser l'activité globale de la membrane ; de ce fait, elle provoque également une chute de σ . La chute de σ a pour conséquence un relèvement du profil du substrat qui compense en partie la perte d'activité dans le cas particulier de cette cinétique d'ordre 1.

Ceci peut également s'expliquer de la manière simplifiée suivante :

.en tout point de la membrane, la vitesse de la réaction est de la forme :

$$v = a\,S$$

l'introduction de l'inhibiteur fait chuter a, mais également σ ($\frac{e^2}{\overline{D}^*}$ a) ce qui provoque l'augmentation de S ; la baisse d'activité se trouve amortie.

3° Influence des contraintes de diffusion sur une réaction parfaitement réversible

Le modèle expérimental étudié est une membrane porteuse de phosphoglucose isomérase, coréticulée avec une protéine inactive. Cette enzyme catalyse la transformation réversible du D-glucose 6 phosphate (G-6 P) en D fructose-6 phosphate (F-6 P).

Les caractéristiques du modèle expérimental sont les suivantes :

-activité de la phosphoglucose isomérase :

D-glucose-6 phosphate ⇢ D-fructose-6 phosphate

$$V_{M_1} = (1,13 \pm 0,05) \times 10^{-3} \text{moles cm}^{-3}\text{h}^{-1}$$

-constantes de MICHAELIS :

D-fructose-6 phosphate ⟶ D-glucose-6 phosphate

$$K_{M_1} = (1 \pm 0,05) \times 10^{-7} \text{moles.cm}^{-3}$$

D-glucose-6 phosphate ⟶ D-fructose-6 phosphate

$$K_{M_2} = (3,45 \pm 0,2) \times 10^{-} \text{ moles.cm}^{-3}$$

-Rapports des concentrations à l'équilibre :

$$\frac{[\text{D-fructose-6 phosphate}]}{[\text{D-glucose-6 phosphate}]} = 0,5 \pm 0,05$$

-Coefficients de diffusion :

pour le D-fructose-6 phosphate

$$\bar{D}_S^* = (0,40 \pm 0,03) \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$$

pour le D-glucose-6 phosphate

$$D_p^* = (0,47 \pm 0,03) \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$$

-Epaisseur de la membrane :

$$e = (3,5 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{cm}$$

Figure 23, nous confrontons les valeurs expérimentales et calculées de quelques flux instantanés, au cours de l'évolution d'un système ayant au temps zéro une concentration nulle en G-6 P et de $1,2\ 10^{-6}$ moles cm^{-3} en F-6 P.

La figure 24 présente l'évolution de la concentration en fructose-6 phosphate pour l'enzyme en solution et inclus dans une membrane.

Le ralentissement de la réaction provoquée par l'accumulation du produit est considérablement accru par les contraintes de diffusion. Dans le milieu intramembranaire, par le jeu des profils en creux du substrat et en dôme du produit, le rapport des concentrations se rapproche plus vite du rapport d'équilibre.

Les profils calculés de concentration intramembranaire au cours de l'évolution du phénomène sont donnés à titre explicatif dans la figure 25.

4° *Effet de feed-back d'une variation de pH local sur la cinétique d'une enzyme en phase insoluble*

Dans le chapitre I, nous avons montré que l'uréase montrait à la fois une activité plus pH-dépendante et un décalage de son pH-optimum après insolubilisation (fig. 4 et 7). Le déplacement du pH optimum, également observé par GOLDMAN et al. (1968_a) pour la papaïne sur support de collodion, est provoquée par une différence entre le pH mesuré dans la solution et le pH réel au coeur de la phase insoluble. Dans les systèmes où des substrats neutres donnent des produits ionisés, leurs *profils de concentration dans la phase insoluble provoque une variation du pH local*.

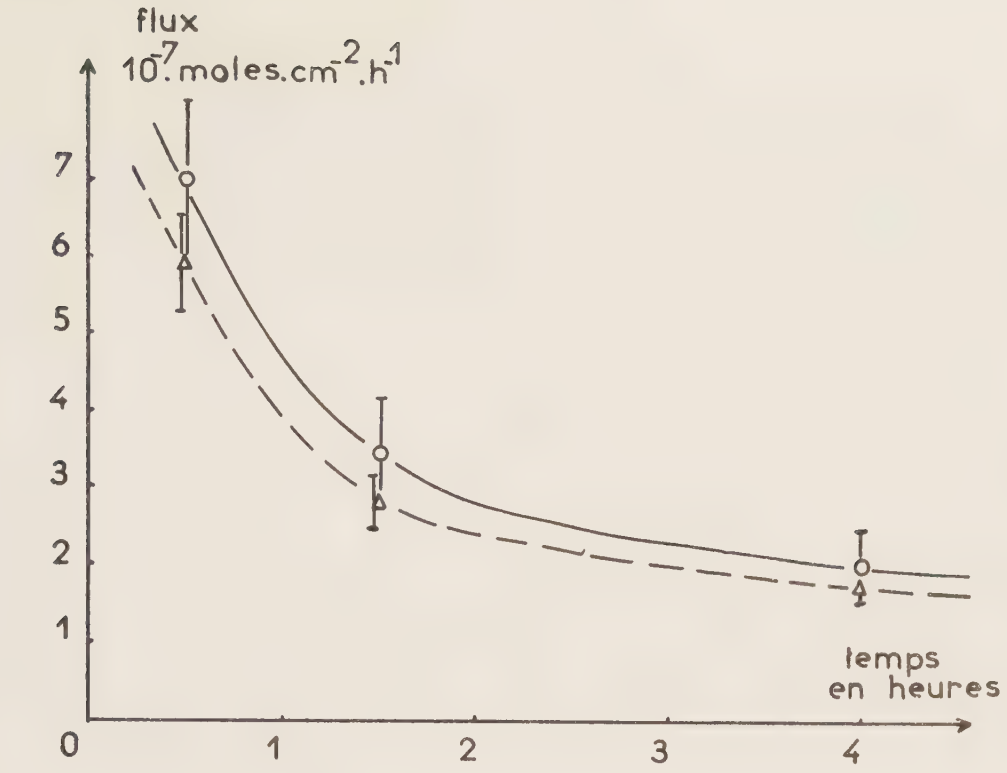


FIG. 23 : FLUX ENTRANT DE FRUCTOSE - 6 PHOSPHATE CALCULES (- O -) ET MESURES(-- Δ --), EN FONCTION DU TEMPS, POUR UNE MEMBRANE PORTEUSE DE GLUCOSE - 6 PHOSPHATE ISOMERASE.

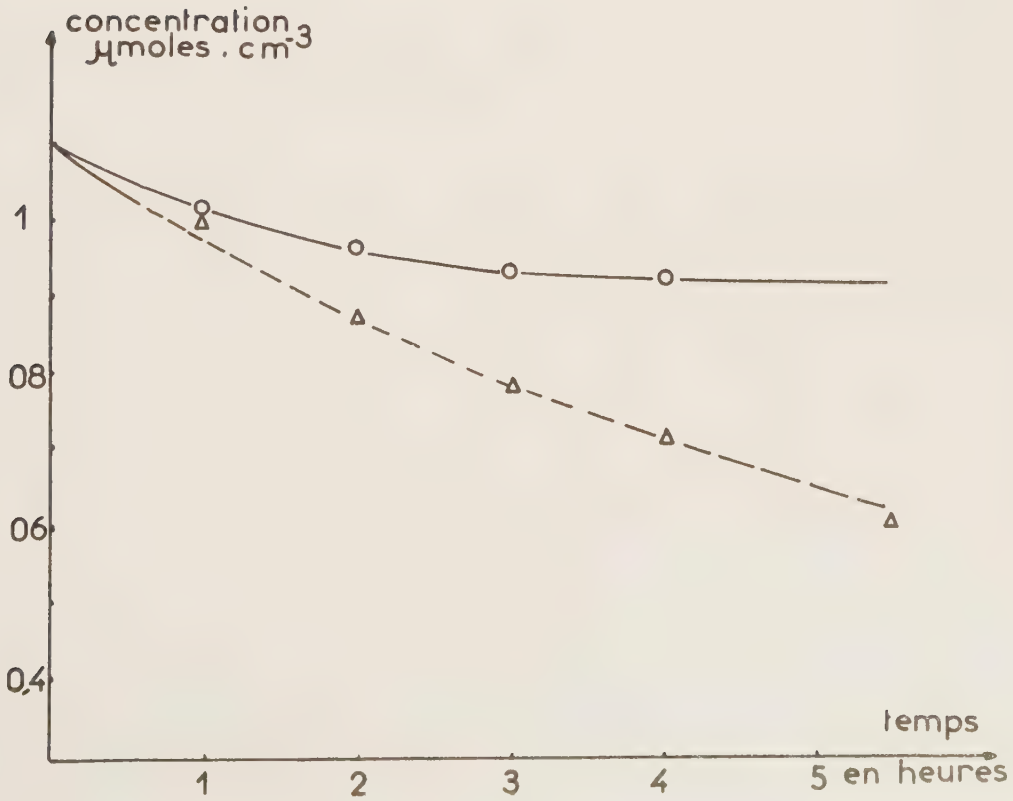


FIG. 24 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN FRUCTOSE - 6 PHOSPHATE DANS UN MILIEU CONTENANT DE LA GLUCOSE - 6 PHOSPHATE ISOMERASE FIXEE DANS UNE MEMBRANE (- O -) ET EN SOLUTION (- - Δ - -).

Cette variation, qui peut être une diminution (papaïne) ou une augmentation (uréase), provoque un déplacement du pH optimum apparent dans l'un ou l'autre sens. L'ampleur de ce décalage est lié aux profils de concentration des produits, à leurs constantes de dissociation et au pouvoir tampon du milieu réactionnel.

L'évolution de l'activité de l'uréase en solution et en membrane, lorsqu'on laisse le produit s'accumuler, est présentée figure 26. Une chute beaucoup plus rapide de la vitesse d'apparition du produit est observée pour le système hétérogène. Cet effet accru de feed-back vient de l'existence d'un décalage cinétique temporaire de pH entre la zone membranaire et le milieu extérieur, associé avec la pH-dépendance accrue de l'activité enzymatique.

Le flux du substrat entrant dans la membrane peut être calculé dans un tel système en fonction de la concentration en produit dans le milieu extérieur (P_1) :

$$J_1 = \frac{e}{2} V_M \frac{\alpha_1}{1 + \alpha_1} \left[1 - f(P_1)\right] \frac{1 + \beta_1}{1 + 2\beta_1}$$

avec : $$\beta = \frac{1}{12} \left[\frac{\sigma}{(1 + \alpha_1)} (1 - f(P_1) + \sigma \gamma \frac{\alpha_1}{1 + \alpha_1} \right]$$

$$\alpha_s = \frac{S}{K_{M_s}} \qquad \alpha_p = \frac{P}{K_{M_p}}$$

$$\gamma = \frac{D_s}{D_p} \qquad \sigma_s = \frac{e^2 V_M}{D_s K_M}$$

La fonction expérimentale $f(P_1)$ lie la vitesse de la réaction à la concentration en produit.

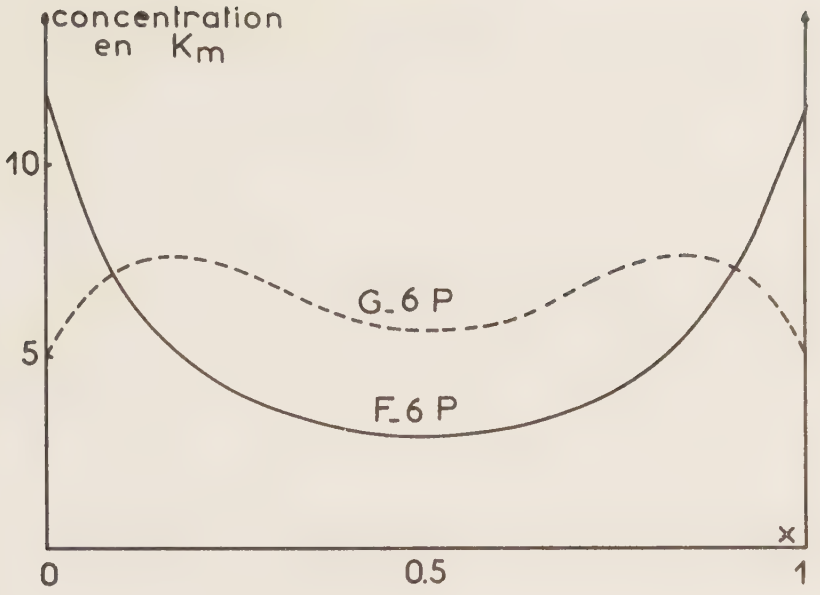


FIG. 25 : PROFILS DE CONCENTRATION EN SUBSTRAT (⟷) ET PRODUIT (---) DANS UNE MEMBRANE CATALYSANT UNE REACTION REVERSIBLE.

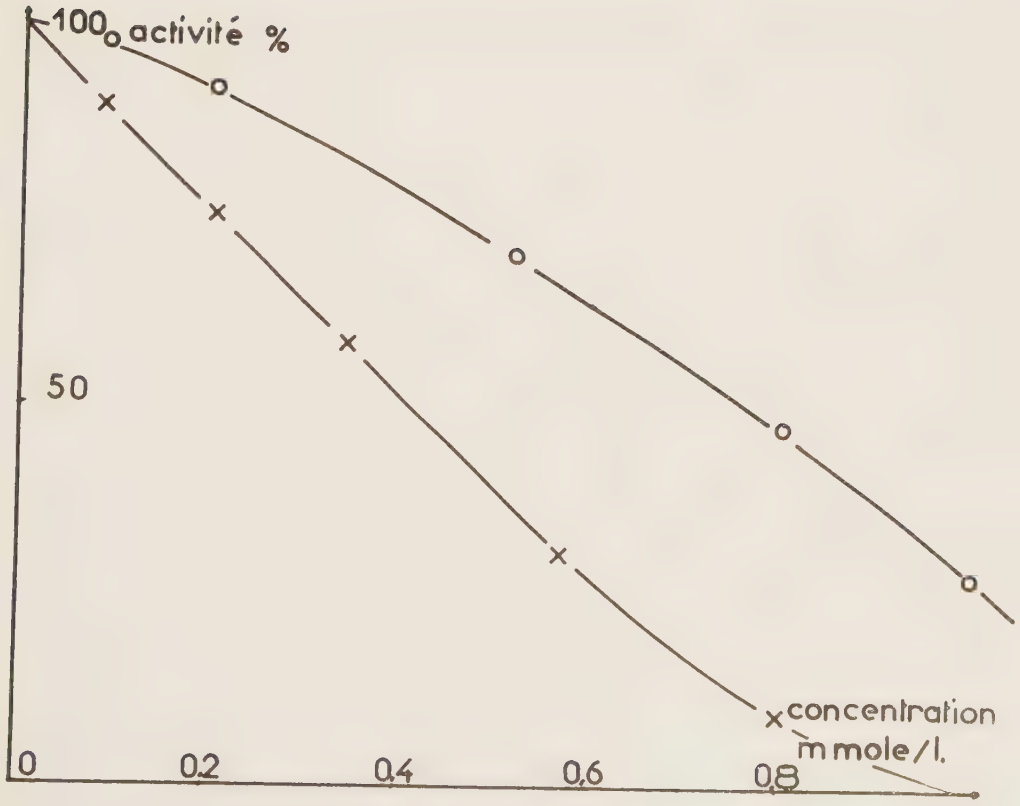


FIG. 26 : ACTIVITE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU PRODUIT ACCUMULE POUR L'UREASE INSOLUBLE (- X -) ET EN SOLUTION (- O -).

B - SYSTEMES ASYMETRIQUES : ETUDE EN VUE DE L'ELABORATION DE MODELES DE TRANSPORT

Les deux concentrations S_1 et S_2 sont différentes. Les systèmes sont régis par les équations (38) et (39). Les profils de concentration en substrat appartiennent aux groupes A, B ou C précédemment définis.

Les résultats présentés ont été obtenus avec une membrane réalisée par coréticulation entre des molécules d'albumine et de glucose-oxydase. Le système a les caractéristiques suivantes :

-Activité par unité de volume de membrane :

$$k_2 E_0 = 3{,}66\ 10^{-3} \text{ moles cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$$

-Coefficient de diffusion effectif moyen :

$$\overline{D}^* = 0{,}5\ 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$$

-Constante de MICHAELIS :

$$K_M = 1{,}3\ 10^{-5} \text{ moles cm}^{-3}$$

-Epaisseur de la membrane :

$$e = 0{,}5\ 10^{-2} \text{ cm}$$

-pH 6,5, sous barbotage d'oxygène

-"Time-lag" du système en diffusion simple :

$$L = \frac{e^2}{6\ \overline{D}} \quad \# \text{ ou } \simeq 3 \text{ secondes}$$

$$\sigma = \frac{e^2\ V_M}{\overline{D}^*\ K_M} = 1{,}4$$

Pour obtenir toute la gamme des valeurs relatives possibles de S_1 et S_2 , donc tous les types de profils intramembranaires de concentration en S, nous suivons l'évolution d'un seul système au cours du temps. Nous partons de deux valeurs de S_1 et de S_2 telles que le profil dans la membrane soit du type A (J_1 et J_2 positifs). Nous mesurons les flux dans le système jusqu'à ce que les concentrations de part et d'autre du film soient devenues égales.

Les résultats consignés sur les figures 27 et 28 concernent un système dont les concentrations de départ sont suffisamment grandes par rapport au K_M pour assurer une cinétique d'ordre zéro en tout point de la membrane pendant le déroulement de l'expérience.

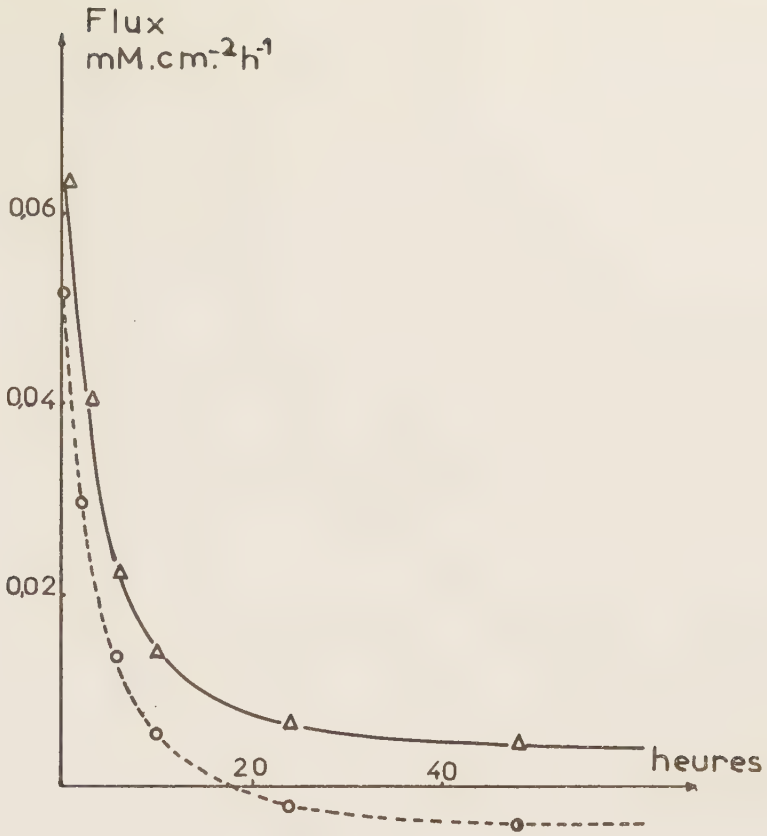
Sur les figures 29 et 30, les résultats concernent l'évolution d'un système dans lequel l'appauvrissement en substrat au cours du temps est tel que la cinétique prend tous les ordres possibles entre zéro et un. Les points représentés sur ces quatre figures (27 à 30) sont les valeurs expérimentales ; les tracés sont les prévisions théoriques. La courbe 27 est calculée à partir des équations (10) et (11), elle concerne un système dans lequel S est constamment grand devant K_M.

Le tracé de la figure 29 a été calculé à l'aide des équations (32) et (33).

Nous donnons à titre de référence les courbes obtenues en diffusion simple.

Les figures 28 et 30 représentent la variation des flux instantanés entrant et sortant au cours du temps. Les flux mesurés représentés par les points sont une vérification expérimentale des pentes des profils calculés aux bornes de la membrane. Les flux calculés sont représentés par les tracés des courbes :

FIG. 27 : EVOLUTION DES FLUX INSTANTANES DE GLUCOSE ENTRANT (- Δ -) ET SORTANT (- - 0 - -) DE LA MEMBRANE (les figures 27 et 28 concernent la même expérience).



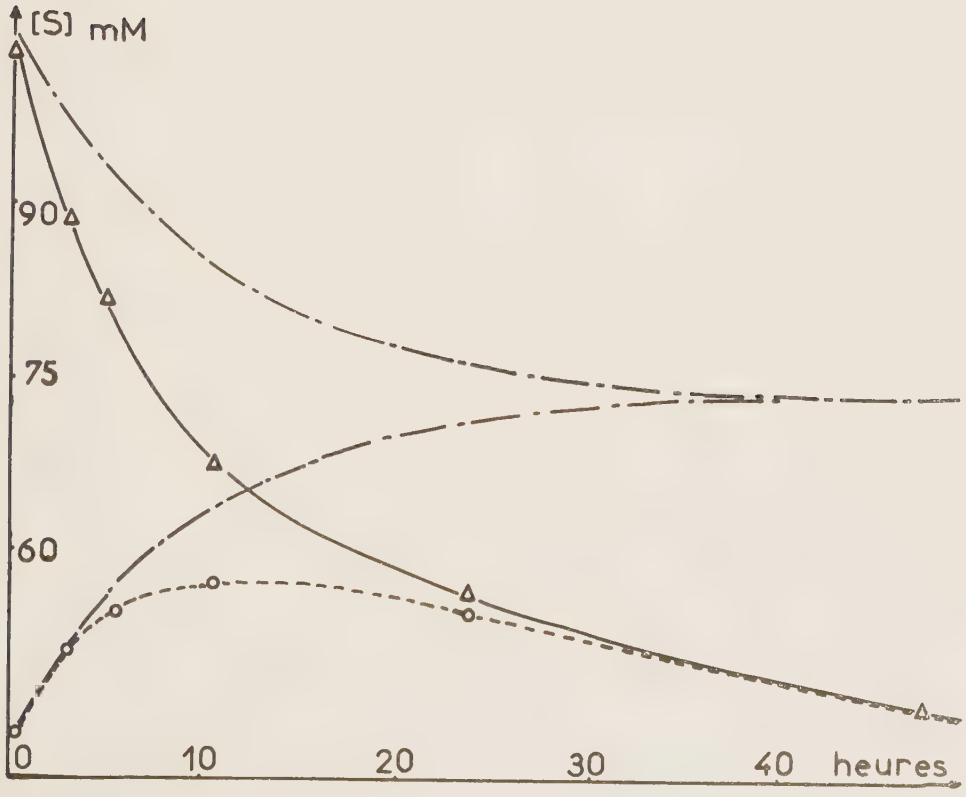
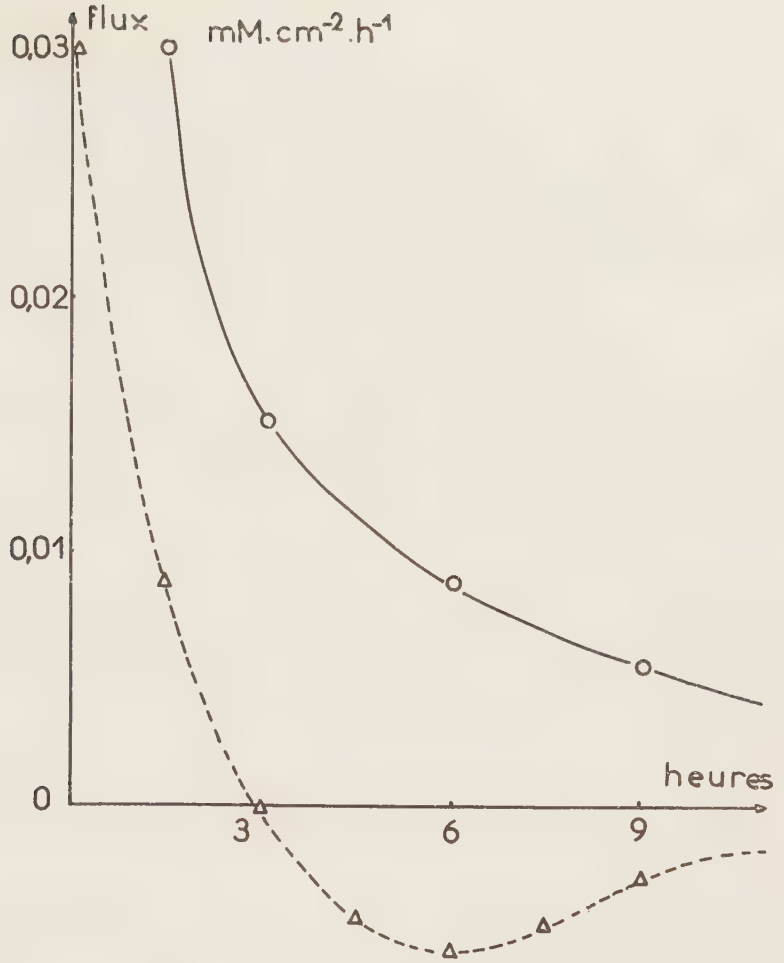


FIG. 28 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE DANS LES COMPARTIMENTS DONNEUR (- Δ -) ET ACCEPTEUR (- - 0 - -). LES COMPARTIMENTS SONT SEPARES PAR UNE MEMBRANE DE GLUCOSE - OXYDASE DONT LES CARACTERISTIQUES SONT DONNEES DANS LE TEXTE. LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT EST TRES GRANDE PAR RAPPORT A K_M - LES COURBES EN DIFFUSION SIMPLE SONT EGALEMENT PRESENTEES (— - —).

FIG. 29 : EVOLUTION DES FLUX INSTANTANES DE GLUCOSE ENTRANT (- O -) ET SORTANT (- - Δ - -) DE LA MEMBRANE.
(les figures 29 et 30 concernent la même expérience).



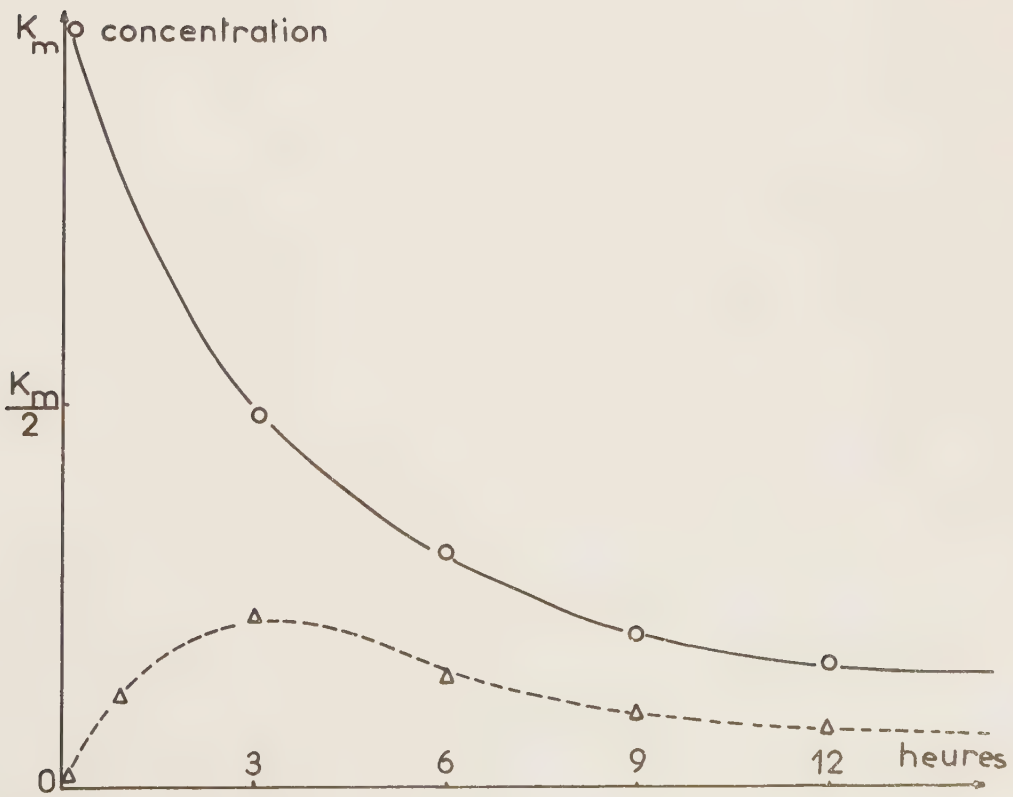


FIG. 30 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DU GLUCOSE DANS LES COMPARTIMENTS DONNEURS (- O -) ET ACCEPTEURS (- Δ -). LES COMPARTIMENTS SONT SEPARES PAR UNE MEMBRANE DE GLUCOSE - OXYDASE ET LA REACTION ENZYMATIQUE N'EST PAS D'ORDRE ZERO.

-la bonne concordance entre l'expérience et les valeurs calculées justifie l'utilisation d'états quasi-stationnaires successifs pour prévoir l'évolution de ces systèmes. (La faible valeur relative du "time-lag" était au départ en faveur de telles hypothèses).

-les différences profondes qualitatives et quantitatives entre la diffusion simple et la diffusion-réaction apparaissent clairement sur les courbes.

Sur ces courbes, entre l'origine et le maximum de la concentration S_2, c'est à dire pour les valeurs positives de J_2, les profils de concentration en substrat sont du type A (fig. 9).

Pour le maximum de S_2 et l'annulation de J_2 , le profil est de type B (fig. 10).

Après le maximum de S_2 et pour les valeurs négatives de J_2 les profils sont du type C (fig. 11). Les profils D (fig. 12 sont atteints quand le système est retourné à la symétrie.

C H A P I T R E IV

ETUDE DE MEMBRANES HOMOGENES ET STRUCTUREES PORTEUSES D'ENZYMES SEQUENTIELLES

MODELES DE TRANSPORT

Les systèmes présentés dans ce chapitre essaient d'éclairer les relations entre la nature d'un processus métabolique et sa disposition spatiale. La comparaison entre deux systèmes bienzymatiques séquentiels avec et sans structuration spatiale est à cet égard éclairante. La membrane porteuse d'un système disposé de manière anisotropique et asymétrique a un effet catalytique fondamentalement différent de celui d'une membrane homogène.

Avant de présenter les systèmes expérimentaux étudiés, nous essayons de situer notre travail par rapport aux phénomènes de transport d'une manière générale.

Aspects généraux du transport et notion de modèle :

Selon PARK (1960), les modalités de transport à travers les membranes biologiques sont au nombre de neuf, la pinocytose (mécanisme de passage des protéines) et la phagocytose (mécanisme de passage d'agrégats moléculaires) pouvant être classées à part, ces mécanismes dont seuls certains sont sélectifs, sont :

-Diffusion simple : la substance traverse la membrane par des pores aqueux selon son gradient de concentration, sans interaction avec d'autres espèces moléculaires.

-Entraînement par un solvant : la substance traverse la membrane entraînée par un courant de solvant.

-Diffusion sélectivement restreinte par des membranes chargées : la membrane chargée repousse les ions de même signe.

-Diffusion freinée par une barrière lipidique : la substance doit possèder des propriétés de solubilité dans les lipides et dans l'eau.

-Diffusion facilitée : la molécule transportée se combine réversiblement avec un transporteur.

-Diffusion par échange : la molécule ne peut traverser la membrane que complexée avec un transporteur et couplée avec un transfert en sens inverse.

Ces formes de transport à travers les membranes biologiques ont pu être reproduites avec des systèmes artificiels, ce qui a grandement contribué à la compréhension de leurs mécanismes. Par contre, un mode de transfert membranaire n'a pas été reconstitué artificiellement : *le transport actif*.

Rappelons que dans ce type de transfert la substance est transportée contre son gradient de potentiel électro-chimique, ce qui nécessite une réaction apportant une énergie métabolique, sous la forme d'A.T.P. par exemple. Ce phénomène est d'une grande importance car il permet à la cellule d'accumuler des métabolites dont la concentration dans le milieu environnant est faible, de rejeter des substances indésirables, de faire apparaître des potentiels de membrane et probablement de maintenir le volume cellulaire normal.

Nous pensons que l'élaboration d'un système artificiel peut avoir un rôle explicatif sur les mécanismes de ce type de transport. En 1960, P. MITCHELL au Symposium de Prague, sur les phénomènes de transport, disait déjà :

> *"L'analyse des mécanismes métaboliques du transport au niveau moléculaire aura fait un grand pas quand nous saurons réaliser in vitro des systèmes de transport dont la composition chimique et spatiale soit connue, comparables aux systèmes multienzymatiques reconstitués 'artificiellement' en biochimie classique"*

Dans son ouvrage sur les "Mouvements des molécules à travers les membranes cellulaires", W.D. STEIN cite les critères d'acceptabilité de modèles de transport transmembranaire. Les critères choisis exigent que le mécanisme soit moléculaire, qu'il puisse prendre en compte toutes les espèces moléculaires qui y participent et qu'il puisse en particulier tenir compte de la spécificité entre le matériel transporté et le matériel de transport. D'après le même auteur, il doit être acceptable du point de vue physico-chimique et énergétique, et susceptible de mesures expérimentales. Les modèles physico-chimique expérimentaux de transport utilisant des catalyseurs enzymatiques répondent à l'ensemble de ces critères, en particulier au plus difficile : la spécificité.

Il faut bien distinguer les modèles expérimentaux moléculaires de ce type, qui partent de certaines hypothèses considérées comme plausibles sur les mécanismes "réactionnels" des membranes, d'une observation directe par voie expérimentale du comportement des membranes cellulaires naturelles. Il faut de même distinguer ces modèles expérimentaux des modèles purement mathématiques évoqués au chapitre II dont le but est, soit de tester la possibilité *théorique* de certaines relations ou de certains mécanismes de sélection et de transport, soit d'en évaluer les *limites* ou les *paramètres* principaux, compte-tenu de certaines hypothèses préalables.

L'emploi de modèles expérimentaux utilisant des enzymes ne signifie pas que l'on attribue forcément un mécanisme enzymatique classique aux transports transmembranaires. Ces modèles expérimentaux présentent l'avantage, en partant de matériaux relativement bien connus, de mettre en évidence des mécanismes d'accumulation et de transport par l'utilisation de catalyseurs possèdant des caractères d'affinité et de spécificité bien mesurables et qui de plus, sont protéiques comme le sont aussi les protéines de fixation membranaires, et sans doute, des perméases. De plus, non seulement les enzymes sont susceptibles d'imiter le comportement des molécules intervenant dans le transfert actif, mais encore elles servent

de *marqueurs mesurables* permettant de mettre en relation l'activité de transport avec le nombre de sites, la concentration des molécules à transporter, les concentrations éventuelles de cofacteurs, etc.... Enfin, les traitements cinétiques présentés au chapitre II sont maintenant suffisamment au point pour être étendus à de tels systèmes et permettre :

-l'interprétation des observations expérimentales en termes d'équations cinétiques bien définies ;

-la simulation sur ordinateurs de tous les cas possibles découlant des équations, par l'utilisation de toutes les valeurs prévisibles des paramètres tels que les gradients de concentration ; les flux, etc... ;

-la vérification expérimentale dans quelques cas particuliers de la validité des solutions obtenues.

Nous présentons les résultats expérimentaux obtenus avec deux systèmes bienzymatiques.

Dans l'un, deux produits de transformations successives sont formés à partir d'un substrat par des enzymes mélangées d'une manière homogène dans un support membranaire ; dans l'autre, deux enzymes réalisant des réactions inverses se trouvent incluses dans deux couches actives différentes.

Le premier représente le modèle d'un compartiment cellulaire de réaction où se déroule une courte chaine métabolique ; le second est le modèle d'un transport actif couplé avec deux réactions métaboliques utilisant l'énergie fournie par un cofacteur emprisonné dans la membrane. Ce dernier a déjà été décrit parmi les mécanismes réels de transport actif. Il s'agit de la phosphorylation du glucose en présence d'hexokinase et d'ATP, puis de sa déphosphorylation par une phosphatase. Seules

l'asymétrie du système et les conditions de perméabilité respective au glucose et au glucose-phosphate expliquent le transfert sélectif du glucose d'un compartiment à l'autre. Le glucose s'accumule ainsi contre le gradient de potentiel chimique grâce à l'apport d'énergie dû à la dégradation de l'ATP, réalisant un transport actif primaire caractéristique. Certes, depuis les travaux de SOLS (1956), et de CRANE et KRANE (1959), nous savons que le transport actif du glucose ne peut être lié à un tel mécanisme dans l'intestin. Cependant, si cette double réaction enzymatique ne peut être envisagée dans ce cas particulier, des mécanismes de phosphorylation suivi de déphosphorylation en cours de transport ont été mis en évidence par MORGAN et al. (1960) et analysés par VAN STEVENINCK et coll. (1970) chez E. Coli. NORDLIE et SOODSMA (1969) ont de même mis en cause l'activité de la glucose-6-phosphatase dans la réabsorption du glucose par le rein.

Il faut enfin rappeler les travaux de KROPP et WILSON (1970), qui ont montré la présence de sites de fixation de l'hexokinase sur les membranes extérieures de la mitochondrie, ce qui laisse supposer que cette enzyme peut jouer un rôle dans la phosphorylation des glucides en vue de leur pénétration.

Ainsi, le mécanisme proposé ici comme modèle n'est pas obligatoirement exclu en tant que mécanisme naturel d'accumulation cellulaire du glucose ; il en demeure une illustration assez fidèle si l'on s'en tient aux critères énoncés par W.D. STEIN (1967), même s'il est une image considérablement simplifiée des mécanismes que l'on observe aussi bien dans certaines cellules bactériennes que dans certains tissus des organismes supérieurs.

Des essais antérieurs dans ce sens ont été publiés (NIMS 1968, PASYNSKYI et al. 1964), mais notre système est le premier système artificiel qui ait permis de réaliser un véritable transport actif de matériau biologique.

I - ANALYSE THEORIQUE

Nous considérons deux enzymes séquentielles E_A et E_B catalysant chacune deux réactions pratiquement irréversibles telles que S donne p, qui donne à son tour P :

$$S \xrightarrow{E_A} p \xrightarrow{E_B} P$$

Dans des conditions d'état stationnaire, la démarche pour établir les équations est la même, que les enzymes E_A et E_B soient régulièrement réparties dans la phase insoluble ou qu'elles soient localisées dans deux strates différentes.

Dans tous les cas, le produit de E_A est en même temps le substrat de E_B. Il faut distinguer un cas particulier où E_B reforme le substrat initial, donnant ainsi deux réactions de la forme :

$$S \xrightarrow{E_A} P \xrightarrow{E_B} S$$

1er cas : système homogène :

Les deux enzymes E_A et E_B sont réparties dans le système conformément à la figure 31. La membrane étudiée sépare deux compartiments dans lesquels les concentrations de substrats sont S_1 et S_2, celles du produit intermédiaire p_1 et p_2, et celles du produit final P_1 et P_2.

Dans le système étudié, les flux de substrat S ne sont pas modifiés par la présence de l'enzyme E_B. Notre raisonnement porte sur le produit intermédiaire : pour tout volume élémentaire de la membrane, la variation de sa concentration au cours du

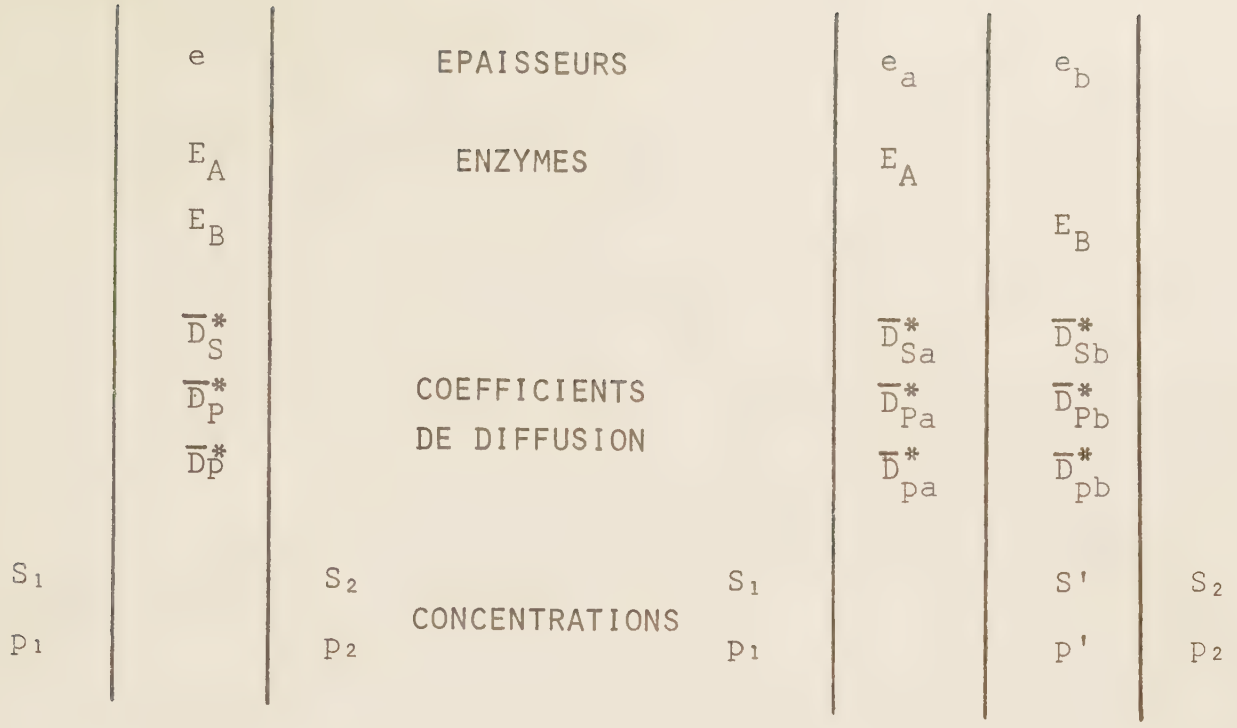


FIG. 31 SCHEMA DE DEUX MEMBRANES BIENZYMATIQUES HOMOGENE ET DOUBLE COUCHE .

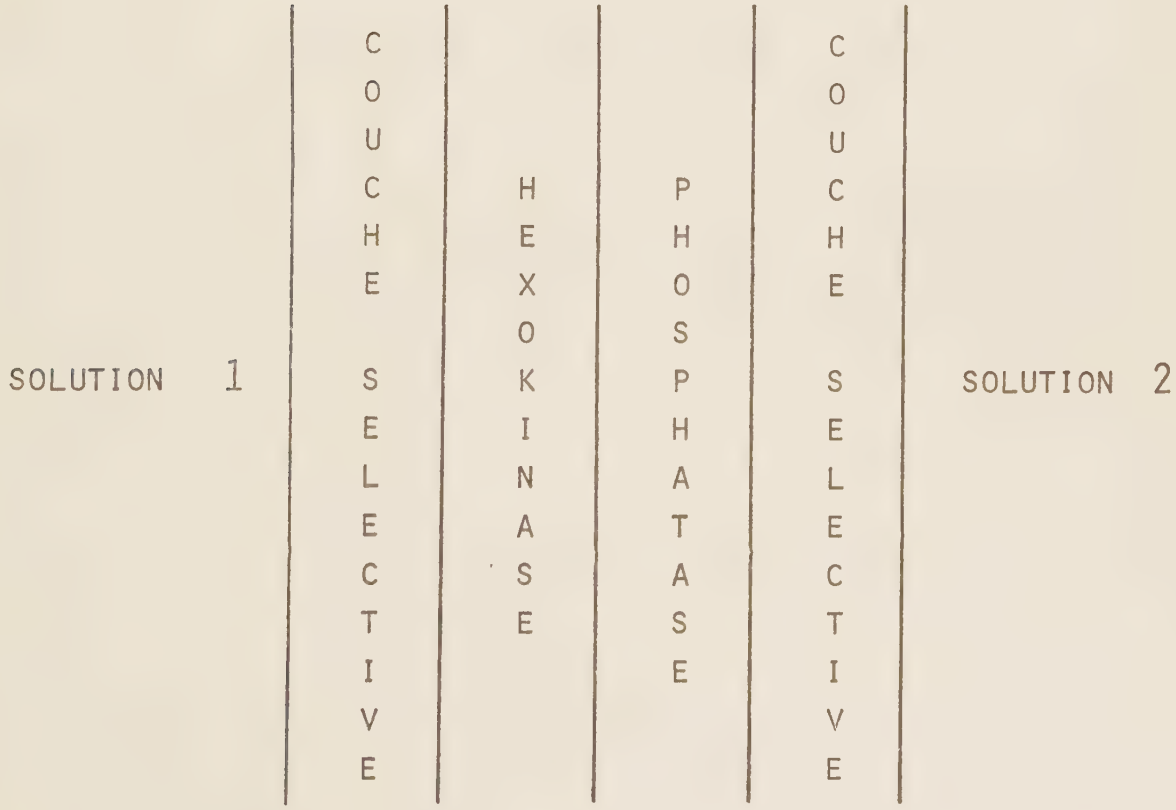


FIG. 32 SCHEMA D'UNE MEMBRANE BIENZYMATIQUE STRUCTUREE AVEC DEUX COUCHES SELECTIVES

temps est dûe à trois phénomènes : son apparition, sa disparition, sa diffusion. Ce qui peut s'écrire :

$$(66) \qquad \frac{\partial p}{\partial t} = \underset{\text{diffusion}}{\left(\frac{\partial p}{\partial t}\right)} + \underset{\text{formation}}{\left(\frac{\partial p}{\partial t}\right)} + \underset{\text{dégradation}}{\left(\frac{\partial p}{\partial t}\right)}$$

La formule de MICHAELIS nous donne les vitesses *d'apparition* et de *disparition* de p.

La cinétique de *diffusion* de p est donnée par la deuxième loi de FICK.

A l'état stationnaire, nous obtenons l'équation différentielle :

$$(67) \qquad \bar{D}^{*}_{p} \frac{d^2 p}{dx^2} = V_{MA} - V_{MB} \frac{p}{K_{MB} + p}$$

Cette équation est résolue selon la méthode de développement en série déjà décrite pour les systèmes monoenzymatiques, chapitre II. Ces solutions permettent d'obtenir les flux entrant et sortant de p :

$$(68 - 1) \qquad J_{p_1} = \bar{D}^{*}_{p} \frac{p_1 - p_2}{e} \rho_{pB_1} + \frac{e}{2} (V_{MB} \lambda_{pB_1} - V_{MA}) \rho_{pB_1} (1 + \beta_{pB_2})$$

$$(68 - 2) \qquad J_{p_2} = \bar{D}^{*}_{p} \frac{p_1 - p_2}{e} \rho_{pB_2} - \frac{e}{2} (V_{MB} \lambda_{pB_2} - V_{MA}) \rho_{pB_2} (1 + \beta_{pB_2})$$

L'équation (67) permet également de calculer les profils de *concentration* de p dans la membrane étudiée.

Nous avons montré précédemment que, dans une membrane porteuse d'une seule activité enzymatique, le profil de la concentration du substrat présente une dépression à l'intérieur de cette membrane. Il en découle une modulation de la transformation globale du substrat au sein de la membrane en fonction de sa concentration dans le milieu extérieur. Dans le système décrit ici, p se trouve formé dans la membrane où sa concentration peut être maintenue au voisinage d'une valeur donnée par un équilibre spontané entre production et consommation.

En effet, si la valeur de $(V_{MB}\ \lambda_{pB} - V_{MA})$ est négative, le sytème produit p ; il en consomme si cette quantité est positive. Si elle est nulle, la concentration de p ne varie pas, et son profil de concentration dans la membrane est horizontal. Ces différents profils sont présentés sur la figure 33.

Ainsi, un certain équilibre existe en permanence entre la production et la destruction de p, produisant une régulation de la concentration de ce produit intermédiaire, à l'intérieur de la membrane qui demeure stable malgré les variations de concentration extérieures de S.

2e Cas : système à double couche :

Dans ce cas, deux couches membranaires sont accolées, la couche (1) ne comprenant qu'une répartition homogène de l'enzyme E_A, la couche (2) une répartition homogène de l'enzyme E_B.

Les réactions sont toujours de la forme :

$$S \xrightarrow{(1)} p \xrightarrow{(2)} P$$

et le raisonnement porte sur le produit intermédiaire p dont la concentration est étudiée pour chacune des couches membranaires.

Dans la couche 1, par un raisonnement semblable à celui du cas précédent, nous obtenons :

(69 - 1)

$$J_{p_1} = \frac{\bar{D}^*_p}{e_a}(p_1 - p') + \frac{\bar{D}^*_s}{e_a}(S_1 - S')\,\rho_{SA_1}\beta_{SA_1} - \frac{e_a}{2} V_{MA_1}\rho_{SA_1}\lambda_{SA_1}(1 + \beta_{SA_2}$$

(69 -2)

$$J_{p_2} = \frac{\bar{D}^*_p}{e_b}(p' - p_2) - \frac{e_b}{2} V_{MB}\,\rho_{pB}\,\lambda_{pB_2}(1 + \beta_{pB_2})$$

Pour la couche 2, la démarche est analogue. A l'état stationnaire, une solution est obtenue par développement en série, en considérant que le flux quittant la couche 1 est égal à celui pénétrant dans la couche 2.

Dans la cas particulier où E_B transforme p pour reformer S, substrat de E_A, nous avons :

$$S \xrightarrow{E_A} p \xrightarrow{E_B} S$$

Ce système donne lieu à une solution banale si les diffusions moyennes de p aux bornes du système sont du même ordre que les diffusions du substrat S. Par contre, si la diffusion de p est limitée à l'espace compris entre les bornes par adjonction sur chaque face externe d'un film sélectif imperméable à p, S aura tendance à décroître dans le compartiment situé du côté de E_A et à s'accumuler dans le compartiment situé du côté de E_B (fig. 34).

Appelons les concentrations en substrat :

-S'_1 et S'_2 aux faces externes du système,

-S_1 et S_2 aux bornes de la partie active,

-S_0 au milieu du système.

Les flux et les profils de S peuvent être calculés comme précédemment.

Le flux entrant dans la première couche active est :

$$J_{S_1} = \bar{D}_S^* \frac{S_1 - S_0}{e} \rho_{S_1} + \frac{e}{2} V_M \lambda_{S_1} \rho_{S_1} (1 + \beta_{S_1}) \tag{70}$$

Celui sortant de la première couche active :

$$J_{S_0} = \bar{D}_S^* \frac{S_1 - S_0}{e} \rho_{S_1} - \frac{e}{2} V_M \lambda_{S_0} \rho_{S_0} (1 + \beta_{S_0}) \tag{71}$$

Celui entrant dans la deuxième couche active :

$$J_{S_0} = \bar{D}_S^* \frac{S_0 - S_2}{e} - \frac{e}{2} V_M \tag{72}$$

Celui sortant de la deuxième couche active :

$$J_{S_2} = \bar{D}_S^* \frac{S_0 - S_2}{e} + \frac{e}{2} V_M \tag{73}$$

Les paramètres utilisés sont :

$\alpha_{S_1} = \frac{S_1}{K_M}$; $\sigma_{S_1} = \frac{e^2}{\bar{D}_S^*} \frac{V_M}{K_M}$; e l'épaisseur

$$\beta_{S_1} = \frac{1}{12} \frac{1}{(1 + \alpha_{S_1})^2} \quad ; \quad p_{S_1} = \frac{1}{1 + 2\beta_{S_1}} \quad ; \quad \lambda_{S_1} = \frac{\alpha_1}{1 + \alpha_1} \tag{74}$$

Les diffusions passives simples du substrat à travers les deux films sélectifs peuvent être représentées par deux équations évidentes de diffusion reliant S_1 et S_2 aux concentrations des solutions extérieures S'_1 et S'_2 . Il est donc possible d'obtenir les valeurs des flux aux bornes extérieures du système J (S_1) et J (S_2) à partir des concentrations extérieures S'_1et S'_2. Les profils de la concentration en S à l'intérieur de la membrane peuvent de même être calculés (fig. 34).

L'expression analytique des flux et profils de p est facilement obtenue en donnant des valeurs nulles aux flux aux bornes du système actif (les films sélectifs étant imperméables à p).

Un faisceau de profils calculés pour une membrane séparant deux compartiments de concentration en substrat S_1 et S_2 est représenté dans la figure 34. Ces profils permettent de montrer l'évolution du système, lorsque S_1 est maintenu constant, après une situation initiale où les concentrations S_1 et S_2 sont égales. Au cours du temps, S_2 croît par rapport à S_1 qui reste pratiquement inchangé (le compartiment 1 étant très grand par rapport à 2).

Il apparaît ainsi qu'une disposition spatiale ordonnée de deux enzymes différentes permet théoriquement de transformer les phénomènes de diffusion-réaction en un transfert de substances d'un compartiment à l'autre, à l'inverse du sens normal lié au gradient de concentration. Il est bien évident que pour que ces deux réactions successives et inverses du substrat vers le produit, puis du produit vers le substrat initial soient irréversibles, il est indispensable que l'une des deux réactions au moins, sinon les deux, s'accompagne d'un transfert énergétique. Dans le cas contraire, nous irions très rapidement vers un équilibre et le déplacement envisagé ne serait plus possible. *Ces hypothèses implicites étant rappelées, il faut signaler que les traitements précédents ont une valeur générale et n'impliquent aucune condition restrictive quant aux choix des réactions envisagées*.

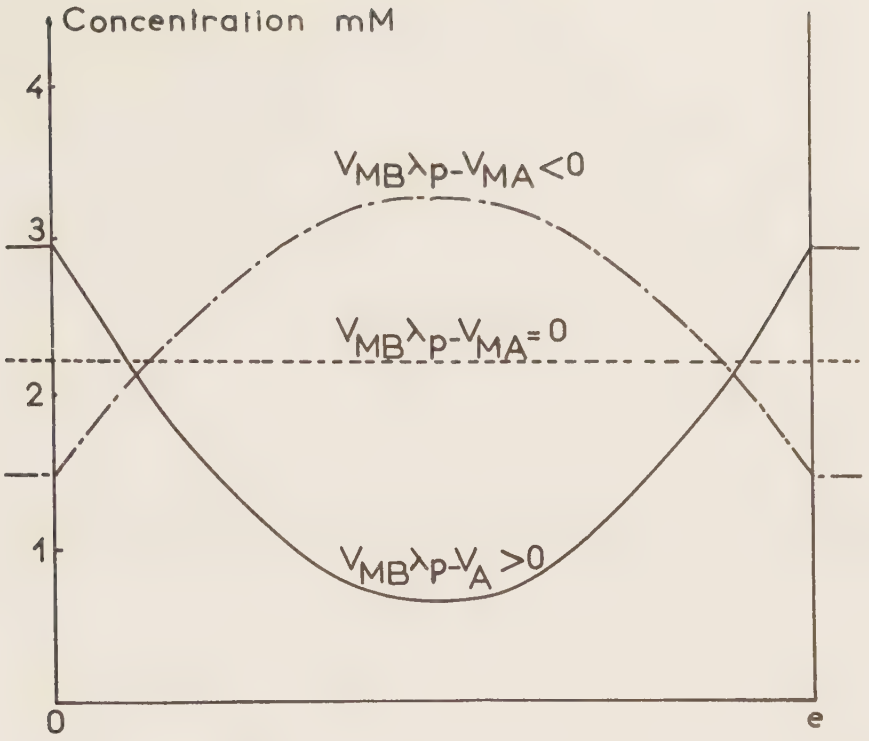


FIG. 33 : DIFFERENTS PROFILS DE CONCENTRATION DU PRODUIT INTERMEDIAIRE DANS UNE MEMBRANE BIENZYMATIQUE HOMOGENE.

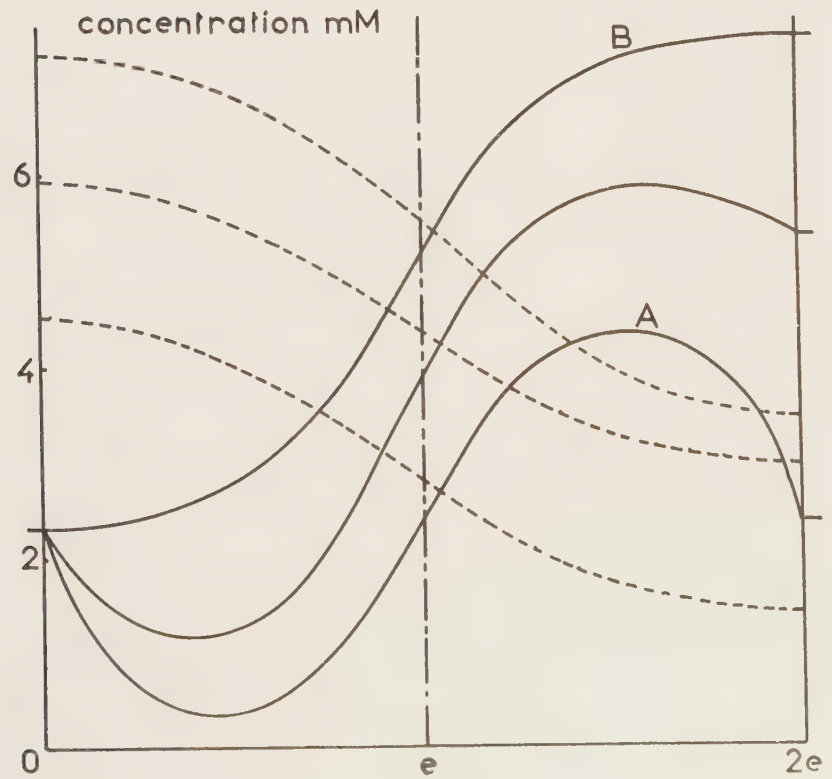


FIG. 34 : DIFFERENTS PROFILS DE CONCENTRATION DANS UNE MEMBRANE BIENZYMATIQUE POUR UN SYSTEME DOUBLE COUCHE HEXOKINASE - PHOSPHATASE (PROFIL DE CONCENTRATION DU GLUCOSE ——; PROFIL DE CONCENTRATION DU GLUCOSE - 6 PHOSPHATE ---).

Un exemple de chacun des systèmes décrits précédemment a été testé expérimentalement. Les systèmes ont été choisis, soit en raison de leur commodité analytique (système monocouche), soit en raison de leur intérêt biologique immédiat (système bicouche). La confirmation expérimentale de la validité des hypothèses et des calculs précédents a ainsi été apportée, comme il apparaîtra à l'analyse des résultats expérimentaux.

II - MEMBRANE HOMOGENE PORTEUSE D'UN SYSTEME BIENZYMATIQUE SEQUENTIEL

C'est un *mélange homogène* en phase insoluble de D-galactosidase et de glucose-oxydase. Ce système est réalisé par coréticulation entre les enzymes choisies et une protéine inactive (albumine) (Méthode décrite chapitre I). Le substrat utilisé est le lactose, hydrolysé en galactose et glucose ; ce dernier est ensuite oxydé en acide gluconique en présence d'oxygène moléculaire.

A - MATERIEL ET METHODES

1° Réalisation des membranes

La membrane est réalisée suivant la technique de coréticulation décrite au chapitre I.

La protéine inactive "support" est l'albumine du plasma en solution à 17,5 %. L'agent de réticulation est le glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,02 M (pH 6,8).

2° *Mesure des flux*

Le dispositif expérimental de mesure des flux a été précédemment décrit au chapitre III. La membrane étudiée sépare deux compartiments contenant 100 ml de solution thermostatée et agitée. Les flux de glucose sont obtenus par dosage enzymatique du glucose dans des prélèvements faits périodiquement dans le compartiment 2. (KEILIN et MARTREE, 1952).

3° *Mesures des activités maximales*

Le sytème couplé est étudié à 25°C avec une solution de lactose (0,15 M) dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2). La solution est soumise à un barbotage d'air.

L'activité β-galactosidase (bovine liver, SIGMA) est mesurée sous barbotage d'air, en suivant l'apparition du glucose par dosage enzymatique.

L'activité glucose-oxydase (aspergillus niger, SIGMA) est mesurée à l'aide d'un "pH-stat" en absence de lactose et en présence d'une solution de glucose 0,15 M dans un tampon phosphate 0,005 M (pH 7,2). Le pH est maintenu constant à l'aide de soude 0,1 N.

4° *Mesure des coefficients de diffusion*

Les coefficients de diffusion effectifs du glucose dans les membranes sont obtenus par application de la première loi de FICK en absence d'activité, sous barbotage d'azote.

5° Mesure des constantes de MICHAELIS

Les constantes de MICHAELIS réelles sont déterminées selon la méthode précédemment décrite (chapitre III).

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous donnons les prévisions théoriques et les résultats expérimentaux sur les flux du composé intermédiaire, le glucose, pour deux états stationnaires dans lesquels les flux aux bornes sont de signes différents. Rappelons que les concentrations sont égales de part et d'autre de la membrane, et que les flux sont égaux en valeur absolue pour les deux faces de la membrane.

1° L'activité maximum de chacune des deux enzymes peut être mesurée en présence de l'autre

L'activité maximale de la glucose-oxydase est mesurée, au "pH-stat" dans une solution de glucose en l'absence de lactose :

$$V_{MB} = (4,3 \pm 0,1)\ 10^{-3}\ \text{moles.cm}^{-3}.\text{h}^{-1}$$

L'activité maximale de la β-galactosidase est mesurée en l'absence d'oxygène, donc en l'absence d'activité de la glucose-oxydase, en suivant la formation du glucose :

$$V_{MA} = (1,25 \pm 0,05)\ 10^{-3}\text{moles.cm}^{-3}.\text{h}^{-1}$$

2° *Les autres caractéristiques du système sont les suivantes* :

-Constante de MICHAELIS de la glucose-oxydase (en présence d'air à pH = 7,2) :

$$K_{MB} = (8,5 \pm 0,5)\ 10^{-6}\ \text{moles.cm}^{-3}$$

-Le lactose est en excès dans le milieu, de manière à éliminer des équations son coefficient de diffusion :

-Coefficient de diffusion effectif du glucose :

$$\overline{D}^{*} = (0,14 \pm 0,01)\ 10^{-2}\text{cm}^{2}\ .h^{-1}$$

-Epaisseur de la membrane :

$$e = (3,5 \pm 0,1)\ 10^{-3}\text{cm}$$

3° *Nous présentons deux états stationnaires illustrant les possibilités d'un tel système* :

Dans un cas, le produit intermédiaire *p est produit par la membrane* :

p_1 = concentration en p du côté 1.

p_2 = concentration en p du côté 2.

$p_1 = p_2 = 1,42.10^{-6}$ moles.cm^{-3}

Flux sortant : $J = 8.10^{-7}$ moles cm^{-2} .heure^{-1}

Dans l'autre, *p est consommé par la membrane* :

$p_1 = p_2 = 1{,}4\ 10^{-5}$ moles.cm^{-3}

Flux entrant : $J = 10^{-6}$ moles.cm^{-2} .heure^{-1}

Nous présentons figure 32 les profils de concentration pour ces deux cas expérimentaux.

4° Nous donnons à titre d'exemple une confrontation entre les prévisions théoriques et les résultats expérimentaux

Les paramètres sans dimension définis dans la partie théorique de l'exposé sont obtenus à l'aide des données précédentes.

$$\alpha_{pB_1} = \frac{P_1}{K_{MpB}} = 0.16 \pm 0.01 \quad ; \quad \sigma_{pB_1} = \frac{e^2}{\overline{D}} \frac{V_{MB}}{K_{MpB}} = 4.4 \pm 0.2$$

$$\beta_1 = \frac{1}{12} \sigma \frac{1}{(1+\alpha_1)^2} = 0.27 \pm 0.04 \quad ; \quad \rho_1 = \frac{1}{1+2\beta_1} = 0.65 \pm 0.15$$

$$\lambda_1 = \frac{\alpha_1}{1+\alpha_1} = 0.14 \pm 0.01$$

Ces valeurs sont introduites dans l'équation (32)

$$J = e\,(V_{MB}\,\lambda_{pB_1} - V_{MA})\ \rho_{pB_1}\ (1 + \beta_{pB_1})$$

Le système est symétrique et les concentrations et les flux sont égaux des deux côtés de la membrane.

Les deux résultats concordent donc dans les limites de la précision expérimentale, ce qui montre la validité de notre raisonnement appliqué à la succession de deux enzymes séquentielles mélangées en une seule couche dans une membrane. Ces calculs permettent de prévoir le comportement de systèmes analogues situés au sein de milieux biologiques.

III - MEMBRANES STRUCTUREES PORTEUSES D'ACTIVITES SEQUENTIELLES

Le système présenté fournit un exemple de transfert de glucose contre un gradient de concentration. Il est composé de *deux couches protéiques actives*, préparées séparément et accolées aux films sélectifs pour former une seule membrane.

Les films sélectifs dérivent d'une réticulation d'une protéine non enzymatique (albumine) sur une trame cellulosique ; ils sont perméables au glucose, mais imperméables au glucose-6-phosphate. Cette sélectivité est dûe à un effet de "tamis moléculaire" des films et aux charges de la protéine dont ils sont porteurs. L'albumine est chargée négativement aux pH des expériences comme le glucose-6-phosphate. Leur pK_a est respectivement de 0,94 et 6,11.

Les "films enzymatiques actifs" comportent l'un, l'hexokinase et l'autre, la phosphatase coréticulées avec une protéine inerte (albumine). Ils sont imprégnés d'ATP et entourés de part et d'autre de deux "films sélectifs".

Dans cette membrane asymétrique, le glucose est phosphorylé transitoirement selon le schéma :

(1) glucose + ATP $\xrightarrow{\text{hexokinase}}$ glucose-6 phosphate + ADP

(2) glucose-6 phosphate $\xrightarrow{\text{phosphatase}}$ glucose + phosphate minéral

Chimiquement, le système se comporte donc comme une simple ATPase puisque la somme des deux réactions se résoud en :

ATP $\longrightarrow$ ADP + phosphate minéral

A - MATERIEL ET METHODES

1° *Réalisation des membranes*

La membrane est réalisée suivant la technique de coréticulation décrite au chapitre I.

La protéine inactive "support" est l'albumine du plasma en solution à 17,5 %. L'agent de réticulation est le glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,02 M (pH 6,8).

2° *Mesure des flux*

Le dispositif expérimental de mesure des flux a été précédemment décrit au chapitre III.

La membrane sépare deux compartiments, dont l'un est suffisamment grand pour que la concentration puisse y être considérée comme constante (900 ml). L'autre a un volume de 6 ml. Les flux sont obtenus par prélèvement et dosage par la méthode enzymatique. Les deux compartiments sont thermostatés et agités par des barreaux aimantés.

3° *Mesure des activités maximales*

Chaque enzyme est étudiée séparément sur son support.

Le système est étudié à 25°C dans une solution tampon tris-HCl 0,42 M pH 7 contenant du Mg Cl à 1,3 g/l (nécessaire à l'activité hexokinase)

Dans ces conditions :

-l'activité hexokinasique (levure, SIGMA) est mesurée dans une solution de glucose 10^{-2}M contenant 3 g/l d'ATP, en suivant la disparition du glucose et l'apparition du G-6-P par couplage avec la Glucose-6 phosphate deshydrogénase (par mesure de l'absorption du NADP réduit formé à 340 nm).

-l'activité phosphatasique (SIGMA) est mesurée dans une solution de G-6 P 10^{-2}M, en suivant l'apparition de glucose par la même méthode que précédemment.

4° *Mesure des coefficients de diffusion*

Les coefficients de diffusion effectifs du glucose dans les membranes sont mesurés par application de la première loi de FICK en absence de cofacteurs donc d'activité.

5° *Mesure des constantes de MICHAELIS*

Les constantes de MICHAELIS réelles sont déterminées selon la méthode précédemment décrite (chapitre III).

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

1° Activité maxima de chaque enzyme dans chacune des couches

Le fonctionnement du système est optimal si les V_M sont identiques dans les deux couches. L'obtention d'une telle identité demande un certain tâtonnement préalable, car il faut tenir compte du rendement des fixations et de ses fluctuations possibles. Le rendement moyen en activité enzymatique après fixation est de :

30 % pour l'hexokinase,

57 % pour la phosphatase utilisée.

Ces déterminations préalables étant faites, l'activité des préparations dont nous disposions nous ont permis de fixer la valeur des deux V_M à 10^{-3} moles par cm^3 et par heure.

2° Nous donnons toutes les caractéristiques chiffrées du système étudié

La constante de MICHAELIS mesurée de l'hexokinase pour le glucose est $K_M = 10^{-7}$ moles par cm^3. Celle de la phosphatase acide n'a pas été déterminée, car nous avons constaté que sa cinétique était d'ordre zéro dans nos conditions expérimentales.

Le coefficient de diffusion effectif du glucose dans les deux couches actives est :

$$\overline{D}^* = 0,14\ 10^{-2}.cm^2\ heure^{-1}$$

Celui du glucose-6 phosphate de :

$$\overline{D}^* = 0,04\ 10^{-2}\ .cm^2\ heure^{-1}$$

Dans les deux films sélectifs, le coefficient de diffusion du glucose est :

$$\overline{D}^* = 0,5\ 10^{-3}.cm^2\ heure^{-1}$$

et celui du glucose-6 phosphate est inférieur à $10^{-6}.cm^2\ heure^{-1}$; c'est à dire que les quantités qui diffusent ne sont pas détectables à 340 nm par le système glucose-6 phosphate deshydrogénase-NADP.

L'épaisseur des deux couches actives est de 6.10^{-3} cm ; celui d'un film sélectif de 4.10^{-3} cm.

3° *Importance du transport actif obtenu*

Les solutions de glucose se trouvant dans les compartiments extérieurs de part et d'autre de la membrane sont égales au temps zéro : $S_1 = S_2$.

Le volume du compartiment donneur étant 150 fois supérieur à celui du compartiment receveur, on peut considérer que la concentration dans ce compartiment reste constante pendant toute la durée de l'expérience.

La concentration dans le compartiment receveur est suivie par prélèvement ; elle est représentée figure 35 pour les trois conditions de concentrations initiales suivantes :

$$2,8 \times 10^{-3}M \ ; \ 5,6 \times 10^{-3}M \ ; \ 1,12 \times 10^{-2}\ M$$

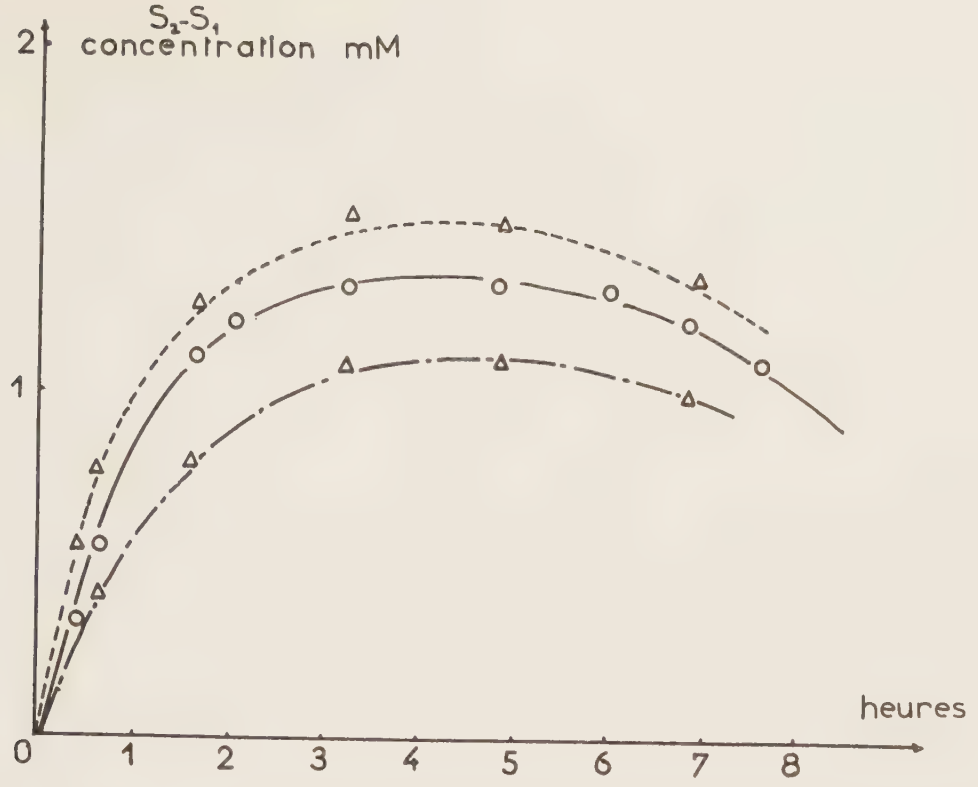


FIG. 35 : Evolution de la concentration en glucose dans le compartiment recepteur du dispositif precedemment decrit pour differentes valeurs de la concentration dans le compartiment donneur.

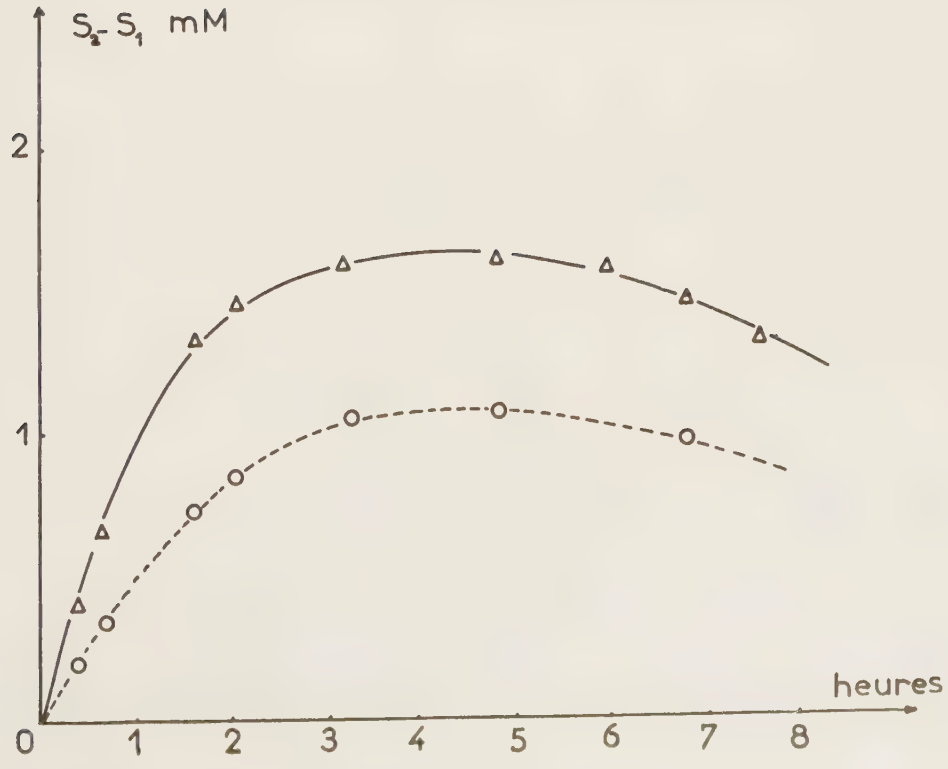


FIG. 36 : Evolution de la concentration en glucose dans le compartiment recepteur en presence (- - -) et en absence de fructose (——). Mise en evidence d'un phenomene de competition.

La concentration S_2 du compartiment receveur croît régulièrement dans un premier temps, pour atteindre un plateau justifié par le profil de concentration B, de la figure 34. La concentration décroît ensuite, une fois que l'ATP enfermé dans la membrane a été consommé. Le système n'est plus en mesure de fournir l'énergie nécessaire pour maintenir le gradient de concentration, et retourne alors progressivement à son état initial.

Dans un système de ce type, le travail permettant la concentration du glucose dans un compartiment nécessite un apport d'énergie supplémentaire pour maintenir les gradients et lutter contre la diffusion simple. Les auteurs qui étudient le transport transmembranaire distinguent généralement le transport actif dans un sens et la diffusion simple en sens contraire. Dans notre système, ces deux composantes du mouvement moléculaire total coexistent et sont étroitement liées entre elles.

Il apparaît que le système de transport peut être saturé à partir de valeurs de S_1 égales à 10^{-2} M, les vitesses initiales de transport et les paliers restant constants.

La présence de fructose dans les compartiments entraîne une réduction de l'effet de transport actif observé. La figure 36 présente le résultat obtenu pour une concentration initiale de $2,8.10^{-3}$ M en fructose.

RENDEMENT ENERGETIQUE DU SYSTEME

La concentration d'une solution diluée, que ce soit ou non par un processus biologique, provoque une diminution de son entropie. Evidemment, concentrer un soluté, et faire ainsi décroître son entropie, nécessite un apport d'énergie. Le changement d'énergie libre, attaché au déplacement des molécules

de glucose d'un compartiment dans un autre, peut être calculé à partir des potentiels chimiques, ou plus simplement des concentrations du glucose dans chaque compartiment.

La relation fondamentale est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G^\circ = R\,T\,\mathrm{Log}\,\frac{S_2}{S_1}$$

S_2 et S_1 étant les concentrations du soluté dans chaque compartiment.

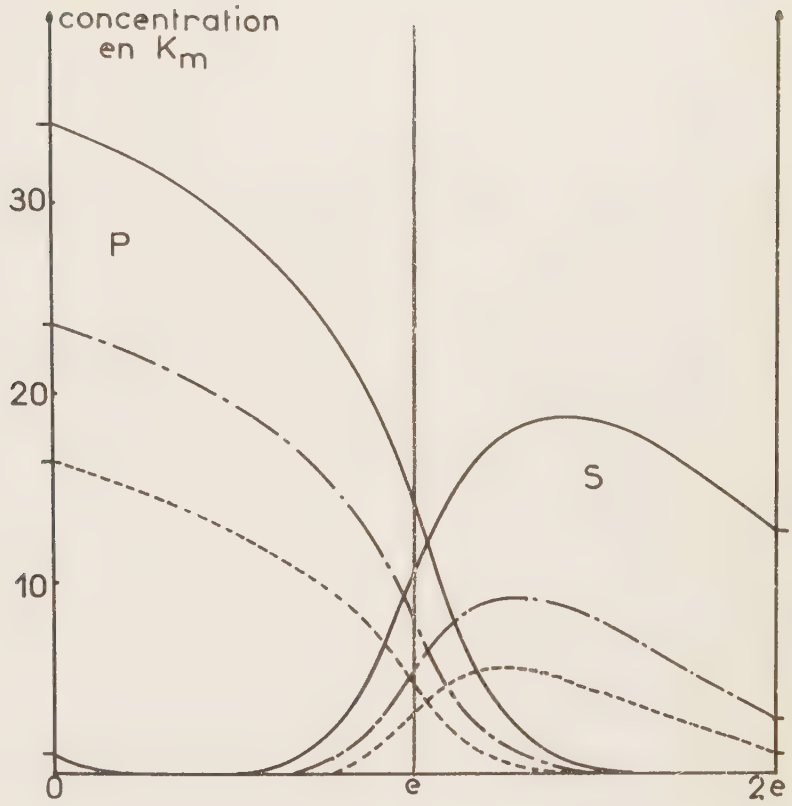
Si nous considérons que la diminution d'énergie libre qui accompagne la décomposition par hydrolyse d'une mole d'ATP en ADP est de 7 000 calories, *le rendement net* de notre "pompe" est compris suivant les gradients entre *3 % et 5 %*.

Malheureusement, ces rendements ne sont qu'indicatifs car les valeurs théoriques qui servent de base pour le calcul du rendement ne sont qu'une estimation de la quantité minimale d'énergie nécessaire pour transporter un soluté donné contre un gradient donné. La principale raison est la tendance constante du soluté à s'opposer au processus de pompage actif. Il en résulte une "fuite" qui oblige la pompe à fournir plus de travail pour maintenir un gradient donné. La thermodynamique classique de l'équilibre est donc inadéquate pour analyser avec précision le travail fourni par un tel système. La thermodynamique des processus irréversibles aborde ces problèmes avec une grande rigueur, mais elle ne peut actuellement permettre une approche thermodynamique quantitative de tels systèmes.

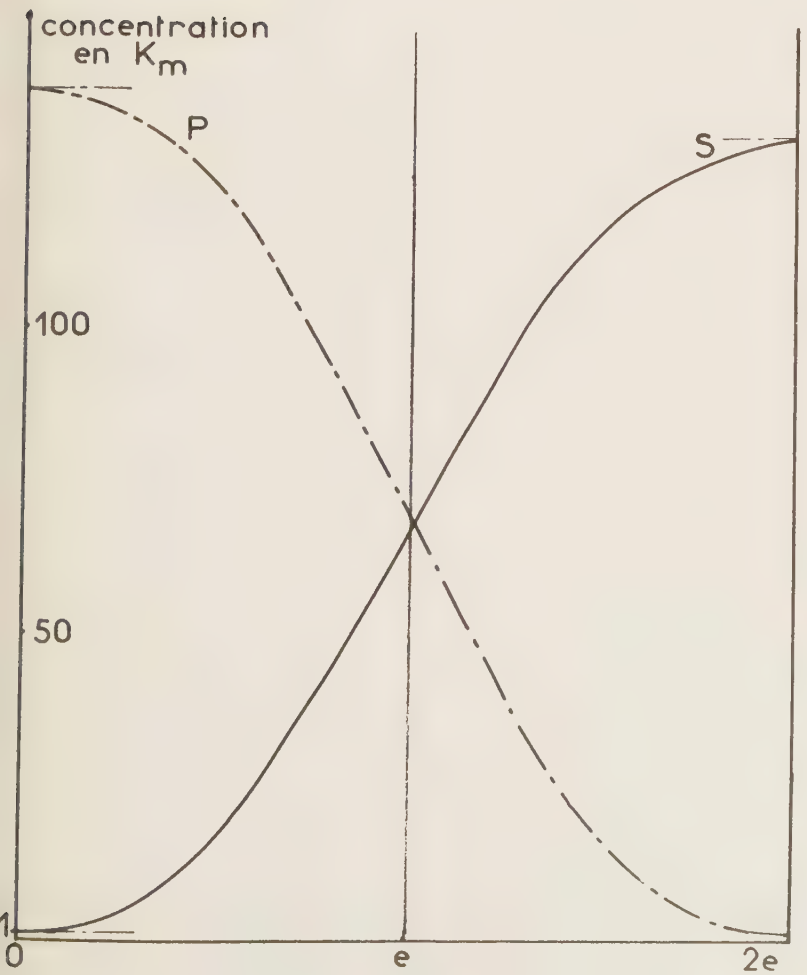
Notre système de transport actif, s'il a le mérite d'exister est encore bien imparfait, par rapport à la réalité biologique.

La grande épaisseur de la membrane, des couches sélectives en particulier, en limite les possibilités. Nous avons simulé sur ordinateur le comportement d'une membrane ayant une épaisseur du même ordre de grandeur que les membranes biologiques, et surtout des couches sélectives pauci-moléculaires.

L'évolution des profils dans le système à partir d'une membrane vide (figure 37_A et 37_B) montre qu'avec une membrane idéale de ce type des concentrations 130 fois plus grandes que dans le milieu extérieur peuvent être obtenues dans le compartiment receveur.



IG. 37 $_A$ ET 37 $_B$: EVOLUTION CALCULEE DES PROFILS DE CONCENTRATION EN PRODUIT ET SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE STRUCTUREE "IDEALE" (FIG. 37 $_A$). L'UNITE DE CONCENTRATION EST LE K_M. A L'ETAT STATIONNAIRE (FIG. 37 $_B$) LA CONCENTRATION DANS LE COMPARTIMENT RECEVEUR EST 130 FOIS PLUS GRANDE QUE DANS LE COMPARTIMENT DONNEUR.



DISCUSSION

La nécessité de disperser les molécules biologiques en solution pour les étudier était un obstacle à l'étude des mécanismes cellulaires. C'est ainsi que M. POLONOVSKI écrivait dans l'introduction de l'un de ses traités : *"Une des limites de nos connaissances provient de ce qu'il est difficile de transposer les résultats obtenus en milieu "homogène" aux structures intracellulaires qui relèvent des lois des réactions hétérogènes".*

Le but de notre travail est de réaliser des membranes actives pouvant servir de modèles de fonctionnement pour des membranes et particules biologiques traversées par des métabolites. La fixation d'enzymes en phase insoluble par liaison chimique est une voie d'abord de telles études.

L'étude bibliographique présentée montre qu'il existe plusieurs groupes de procédés pour fixer des enzymes sur des supports insolubles. Les méthodes d'inclusion et d'adsorption qui ne provoquent pas une véritable liaison entre le support et la molécule active doivent être écartées car elles ne donnent pas une insolublisation durable. Cette fixation définitive est par contre obtenue par les méthodes de liaison covalente directe avec le support.

Nous avons vu qu'au cours des trois dernières années, ces méthodes avaient donné lieu à de nombreuses publications. Les rendements en activité enzymatique sont faibles et la gamme des enzymes fixables par ces méthodes est restreinte : il s'agit le plus souvent d'hydrolases très résistantes à la dénaturation. L'élaboration de modèles avec de telles méthodes est donc difficile et nous avons été amenés à mettre au point des procédés de fixation moins dénaturants. Nous avons obtenu de bons résultats avec une méthode qui consiste en une coréticulation entre les molécules enzymatiques et une protéine inactive qui constitue la trame-support de la membrane.

Par ce procédé, des enzymes très diverses conservent une part importante de leur activité, ce qui nous met en mesure d'élaborer des modèles structurels bi- ou multienzymatiques. L'effet de cette fixation sur les enzymes a été mis en évidence par la comparaison de leurs propriétés avant et après insolubilisation.

1. *Certains caractères ne sont pas modifiés*.

La conservation de la spécificité, l'absence de variation de l'affinité, nous font penser que les sites qui demeurent actifs sont inchangés et ont les mêmes caractéristiques qu'avant la fixation. La réponse serait "tout ou rien", chaque site pouvant soit rester intact, soit être complètement inactivé.

L'absence de variation de l'énergie d'activation va aussi dans ce sens ; les caractéristiques thermodynamiques de la *réaction* demeurent inchangées après fixation.

2. *D'autres, au contraire, subissent des modifications appréciables*.

La résistance accrue à la dénaturation thermique montre que la molécule enzymatique est *stabilisée* par la fixation. Cet effet s'explique par le moindre degré de liberté laissé à la molécule après réticulation ; il est favorisé par la proximité des molécules protéiques entre elles au sein de la structure.

La résistance accrue aux enzymes protéolytiques s'explique par les difficultés rencontrées par ces enzymes pour atteindre leurs points d'impact. Ces empêchements peuvent être stériques, ou dûs au fait que les fonctions permettant l'action de l'enzyme sont engagées dans des liaisons chimiques après le pontage.

La plus grande pH-dépendance de l'activité enzymatique après fixation peut s'expliquer par des considérations sur les phénomènes d'accessibilité et de diffusion des substances à métaboliser.

Le fonctionnement des membranes enzymatiques obtenues, qu'il existe ou non un gradient de concentration entre leurs faces, est régi par deux phénomènes simultanés :

-la réaction enzymatique,
-la diffusion des métabolites.

Nous avons mis en évidence les effets relatifs et réciproques de ces deux phénomènes l'un sur l'autre. Ces *diffusions - réactions* ont pu être traitées mathématiquement ; nous avons établi des équations qui rendent compte *quantitativement* des résultats expérimentaux.

Nos traitements théoriques, contrairement à ceux issus de la thermodynamique des processus irréversibles, permettent l'obtention de valeurs calculées qui peuvent être confrontées avec les résultats expérimentaux. Cette confrontation paraît une étape nécessaire pour vérifier que la méthode adoptée est effectivement applicable aux matériaux biologiques explorés.

Nous avons d'abord présenté des équations établies en faisant l'hypothèse de l'état stationnaire, puis une nouvelle génération de solutions adaptées aux régimes d'évolution. Ces dernières solutions sont obtenues sur ordinateur et permettent le traitement de problèmes de contrôle et de régulation des systèmes évolutifs. Ces traitements semblent donc bien se prêter à l'étude des mécanismes fondamentaux de régulation des systèmes cellulaires.

CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE

L'étude fondamentale de la cinétique enzymatique en phase hétérogène montre que les contraintes d'accessibilité et de diffusion peuvent "moduler" l'activité enzymatique

et influer ainsi profondément sur sa cinétique.

Au cours des dernières années, de nombreux auteurs ont montré que les activités enzymatiques peuvent être régulées en présence d'effecteur par l'intermédiaire de transitions allostériques(MONOD et al. 1963).

Parallèlement à ces mécanismes bien établis par des études en solution, une série de mécanismes en phase hétérogène peuvent être envisagés à partir de ceux qui sont mis en évidence dans nos modèles. Les modifications des conditions d'environnement et des contraintes d'accessibilité peuvent donner des systèmes de régulation tout aussi importants que les mécanismes décrits en phase homogène. Quelques travaux seulement se placent dans cette ligne. GOLDMAN et al. (1968) ont montré que la papaïne fixée sur un support de collodion provoque une modification locale de pH susceptible de moduler la cinétique enzymatique. Nous avons montré que de tels mécanismes de régulation peuvent être liés à un feed-back résultant d'une variation intramembranaire de pH, quand l'uréase est fixée dans une trame protéique. Nous avons déjà évoqué le travail de RICHARDS et QUIOCHO (1964) qui ont étudié l'influence de la structure cristalline des enzymes sur leur cinétique. Leurs études comme nous l'avons montré, ont été limitées par la structure tridimensionnelle de la forme cristalline. Un travail similaire pourrait être réalisé avec la forme membranaire qui simplifie les problèmes en privilégiant une dimension du phénomène.

PHENOMENES DE TRANSPORT

Au fur et à mesure de la progression des connaissances sur les membranes cellulaires, la liste des enzymes impliquées dans les phénomènes de transport s'allonge. Elles sont mentionnées à propos des transports actif et facilité pour les ions, les acides aminés, les sucres. Le rôle joué par ces

enzymes membranaires doit être envisagé dans les hypothèses concernant les mécanismes de permation des métabolites. STEIN (1967) a passé en revue les modèles descriptifs qui ont été proposés par les différents auteurs pour expliquer les mécanismes possibles des phénomènes de transfert et de transport actif en particulier.

Nous avons déjà montré à la fois l'intérêt et les limites de tels modèles, ainsi que la nécessité de réaliser des modèles physico-chimiques expérimentaux simples à l'aide de membranes artificielles pour élucider certains de ces mécanismes.

Rappelons que ces modèles physico-chimiques ont surtout été réalisés jusqu'ici à l'aide de couches lipidiques dans le but d'obtenir des informations sur les propriétés de sélectivité et la structure de tels films dans des milieux biologiques. Les méthodes d'étalement classiques provoquent la dénaturation des protéines et les modèles réalisés avec des films protéiques sont très peu répandus.

Nous avons précédemment évoqué les tentatives de NIMS (1968) et de PASYNSKI et al. (1964) qui ont réalisé des modèles en couplant des enzymes en solution avec une membrane inactive. Ces modèles permettent d'aborder le problème du couplage de la diffusion avec le métabolisme mais ne peuvent par leur nature même mettre en évidence l'influence des phénomènes intramembranaires.

Le travail de GOLDMAN et al. sur une membrane de collodion porteuse de papaïne, qui a été longuement abordé au cours de cet exposé, est le seul travail parallèle au nôtre qui ait été relevé dans la bibliographie. La méthode employée par ces auteurs pour réaliser des membranes nécessite des études expérimentales et théoriques préalables, longues et difficiles avant de les utiliser pour élaborer des modèles. Des confrontations entre prévisions théoriques et résultats expérimentaux n'ont pas encore été publiées sans doute pour ces raisons techniques.

A notre connaissance, ces travaux n'ont conduit ni à l'obtention de transferts vectoriels, ni à la réalisation d'un système artificiel de transport actif.

Pour mettre en évidence les relations entre les activités catalytiques et leur répartition spatiale au niveau des supports, nous avons présenté deux systèmes bienzymatiques séquentiels en phase insoluble dont les caractéristiques et la signification sont essentiellement différentes, et dont la comparaison est à cet égard éclairante.

L'un n'est pas à proprement parler un système structuré : c'est un système figé où les contraintes de diffusion introduisent des caractéristiques particulières de micro-environnement. la répartition homogène des sites dans le système β-galactosidase glucose-oxydase fait que le résultat de son action est qualitativement identique à celui obtenu à partir du mélange de ces deux enzymes en solution. Des différences quantitatives importantes se révèlent toutefois, surtout si l'on compare la concentration en glucose, produit intermédiaire, au sein de la structure membranaire. En effet, la vitesse de transformation du glucose dans cette structure, et le profil de sa concentration dans la membrane, entraînent une stabilité de cette concentration au cours du temps bien supérieure à celle que l'on observe en solution. Cet effet régulateur doit présenter un intérêt non négligeable en maitenant autour d'un niveau donné la concentration de tel ou tel métabolite intermédiaire dans certains compartiments spécifiques, atténuant ainsi des à-coups liés aux discontinuités des processus métaboliques. On peut donc dire que le fonctionnement de cette structure est intéressant à considérer en tant que modèle de compartiment isolé, siège de transformations métaboliques plutôt que spécifiquement en tant que modèle de membrane biologique.

Il n'en est pas de même pour le système bienzymatique structuré en double couche présenté simultanément. Il s'agit là au contraire d'un effet spécifique de transfert spatial lié à la structure, c'est-à-dire à la disposition délibérée

d'éléments fonctionnels dans l'espace. Si l'on se contente d'effectuer un bilan chimique de la double réaction présentée, le résultat apparaît comme une simple hydrolyse de l'ATP, et le couple enzymatique fonctionne comme une ATPase. Vue globalement, cette hydrolyse de l'ATP ne renseigne pas sur les potentialités de ce système catalytique. Pour appréhender l'importance de ce système, il faut tenir compte de sa structure spatiale et plus exactement de sa dissymétrie.

Cette préoccupation, que nous devons à CURIE (1908), n'apparaît pas dans l'écriture classique des équations chimiques. Selon le principe de CURIE, les phénomènes ne possédant pas de dissymétrie ne peuvent avoir de conséquence vectorielle. Ainsi, la réaction en solution ou dans une phase insoluble isotrope ne peut donner lieu à des phénomènes de "catalyse vectorielle" ou de transport. Il en est évidemment de même si un transporteur d'ions est isolé de la membrane qui le porte, et se trouve dispersé en solution.

Dans le sytème décrit ici, le transport est provoqué par l'anisotropie dans la répartition des sites actifs. Cette anisotropie accroît la probabilité de la présence des molécules de glucose dans l'un des compartiments du sytème au détriment de l'autre compartiment. Notre système donne ainsi un contenu physico-chimique expérimental à l'expression de "catalyse vectorielle".

Les mécanismes proposés demeurent valables quelle que soit l'épaisseur des couches actives ou leur surface. Il est extrapolable au cas où deux sites enzymatiques différents se trouvent sur la même molécule, à condition que celle-ci soit orientée au sein de la structure. Il est donc applicable au fonctionnement de l'ensemble des molécules responsables d'une "catalyse vectorielle". Il paraît en particulier adapté à l'interprétation de l'action des ATPases liées au transfert actif du sodium et du potassium et possèdant deux sites catalytiques différents (kinase et phosphatase) dans la mesure

où elles sont, comme il paraît aujourd'hui vraisemblable, orientées dans la structure membranaire. Il pose indirectement la question du rôle possible dans divers transports des ATPases mises en évidence au niveau des membranes cellulaires. Une telle interprétation apparaîtra peut être grâce à la multiplication des études du transport transmembranaire actuellement en cours par de nombreuses équipes.

De toute manière, l'interprétation moléculaire des phénomènes naturels observés nécessitera des modèles plus raffinés et plus diversifiés.

* *

*

Dans notre équipe, différents points soulevés par le travail présenté sont soumis actuellement à des études plus approfondies. La cinétique enzymatique hétérogène est étudiée en faisant intervenir des inhibiteurs, des activateurs et des cofacteurs sur des systèmes constitués de plusieurs enzymes par MM. GELLF, LECOQ et COLETTE, c'est-à-dire dans des conditions proches de celles qui sont rencontrées dans les milieux biologiques.

Dans le domaine des modèles de transport, l'extension du principe présenté pour le glucose à d'autres substances est en cours.

La réalisation de membranes structurées lipides-protéines-eau par Mme de BERNARDY nous permet d'envisager une relation plus fine de la structure et de la fonction dans nos modèles.

Par analogie avec le modèle de transport actif décrit, Monsieur DAVID tente d'élaborer des modèles de transport actif de molécules chargées.

REFERENCES

AXEN R., PORATH J. (1966)
Nature, 210, 367.

AXEN R., MYRIN P.A. ET JANSON J.C. (1970)
Biopolymers, 9, 401.

AXEN R. ET MALBRUMM E. (1969)
Biochem. Biophys. Acta, 191, 478.

AXEN R. ET ERNBACK S. (1971)
European J. of Biochem., 18, 351.

BAR-ELI A. ET KATCHALSKI E. (1963)
J. Biol. Chem., 238, 1690.

BARNETT L.I. ET BULL L.I. (1959)
Bioch. Bioph. Acta, 36, 244.

BERNFELD P. ET WARN J. (1963)
Science, 142, 678.

BERNFELD D., BIEBER R.E. ET MAC DONNEL P.C. (1968)
Archives of Biochem. and Bioph., 127, 779.

BERNFELD P. ET BIEBER R.E. (1969)
Archives of Biochem. and Bioph., 131, 2.

BERNFELD P., BIEBER R.E. ET WATSON D.M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta, 191, 570.

BERTHELOT N. (1949)
Rapport de Chimie Appliquée (PARIS), p. 254.

CRANE R.K. ET KRANE S.M. (1959)
Biochim. Biophys. Acta, 20, 568.

CROOK E.M. (1968)
Proc. Biochem. Soc., 107, 1 P.

CURIE P. (1908)
"Oeuvres" 118-141, Gauthier-Villars, PARIS.

DE SIMONE J.A. AND CAPLAN S.R. (1969)
Symposium "Interphase Mass transfer in Biological Systems"
New-Orleans, Lousianne.

GELLF G. (1971)
Thèse de 3e Cycle - ROUEN.

GOLDMAN R., SILMAN H.I., CAPLAN S.R., KEDEM O. ET KATCHALSKI E.(1965)
Science, 150, 758.

GOLDMAN R., KEDEM O., SILMAN M.I., CAPLAN S.R. ET KATCHALSKI E.(1968_A)
Biochemistry, 7, 486.

GOLDMAN R., KEDEM O. ET KATCHALSKI E. (1968_B)
Biochemistry, 7, 4518.

GOLDMAN R., KEDEM O. ET KATCHALSKI (1971)
Biochemistry, 10, 165.

GOLSTEIN L., LEVIER Y. ET KATCHALSKI E. (1964)
Biochemistry, 3, 1913.

GREEN M.L. ET CRUTCHFIELD G. (1969)
Biochem. J., 115, 183.

GUILBAUT G.G. ET MONTAVIO J.G. (1969)
J. of American Chem. Sty, 91, 2164.

HAYNES R. ET WALSM K.A. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 223.

HORNBY W.E., LILLY M.A. AND CROOK E.M. (1966)
Biochem. J., 98, 420.

HYVARINEN E. ET NIKKILA E. (1962)
Clinica Chim. Acta, 7, 142.

JAGENDORF A.T., POTCHORNIK A. ET SELA M. (1963)
Biochem. Biophys. Acta, 78, 516.

KATCHALSKI A. (1960)
"Membrane transport and metabolism"
KLEINZELLER A. et KOTYK A. ed.
Academic Press, New-York.

KAY G. ET CROOK E.M. (1967)
Nature, 216, 514.

KAY G. ET LILLY M.A. (1970)
Biochem. Biophys. Acta, 198, 276.

KEDEM O. ET KATCHALSKY A. (1961)
J. Gen. Physiol., 45, 143.

KEILIN D. ET MARTREE E.F. (1952)
Biochem. J., 50, 341.

KERNEVEZ (1971)
Thèse d'Etat - PARIS.

KROPP E.S. ET WILSON J.E. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 38, 1, 76.

LASER (1952)
Proc. Roy. Soc., B, 140, 230.

LILLY M.A., HORNBY W.E. ET CROOK E.M. (1966)
Biochem. J., 100, 718.

METAYER M. (1969)
Thèse d'Etat - ROUEN.

MICHAELIS L. ET MENTEN M.L. (1913)
Bz, 49, 333.

MICHEEL F. ET EWERS J. (1949)
Makromol. Chem., 3, 200.

MITCHELL P. (1960)
"Membrane transport and metabolism"
KLEINZELLER A. et KOTYK A. ed.
Academic Press, New-York.

MITZ M.A. ET SUMMARIA L.J. (1961)
Nature, 189, 576.

MONOD J., CHANGEUX J.P. AND JACOB F. (1963)
J. Mol. Biol., 6, 306.

MORGAN H.E., POST R.L. ET PARK C.R. (1960)
"Membrane transport and metabolism".
KLEINZELLER A. et KOTYK A. ed.
Academic Press, New-York, p. 423.

NIMS L.F. (1968)
Current in Modern Biology, 1, 353.

NORDLIE R.C. ET SOODSMA J.F. (1959)
Biochim. Biophys. Acta, 191, 636.

PARK C.P. (1960)
"Membrane transport and metabolism"
KLEINZELLER A. et KOTYK A. ed.
Academic Press, New York.

PASYNSKI A.G., MOISSEYEVA L.N. ET ZVYAGIL'SKAYA R.A. (1964)
Biokhimiya, 29, 2.

PORATH J., AXEN R. ET ERNBACK S. (1967)
Nature, 214, 1302.

PRIGOGINE I. (1955)
Introduction to the thermodynamics of irreversible
Process

RABBINS J.B., MAIMORICK J. ET SELA M. (1967)
Immunochemistry, 4, 11.

RICHARDS F.M. ET KNOWLES (1968)
J. Mol. Biol., 37, 231.

RICHARDS F.M. ET QUIOCHO F.A. (1964)
Biochemistry, 52, 833.

RIESEL E. ET KATCHALSKI E. (1964)
Biol. Chem., 239, 1521.

SELF D.A., KAY G. ET LILLY M.A. (1969)
Biotech. Bioeng., 11, 337.

SHARP A.K., KAY G. ET LILLY M.A. (1969)
Biotech. Bioeng., 11, 363.

SOLS A. (1956)
Biochim. Biophys. Acta, 19, 144.

STEIN W.D. (1967)
The movement of Molecules Across Cell Membrane.
Academic Press, inc., New-York.

SUVINOR B.P. ET MANOILOR S.E. (1966)
Biochem. (USSR), 31, 337.

TOSA T., MORI T., FUSE N. ET CHIBATA I. (1967)
Biochemistry

TOSA T., MORI T. ET CHIBATA I. (1971)
Enzymologia, 40, 49.

URIEL J. (1966)
Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 969.

VAN STEVENINCK J. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 203, 376.

WAGNER T., MSU C.J. ET KALLEMER G.
Biochem. J., 108, 892.

WEETALL M.M. (1969_A)
Science, 166, 616.

WEETALL M.M. (1969_B)
Nature, 223, 259.

WEETALL M.M. ET MERSH L.S. (1969)
Biochem. Biophys. Acta, 185, 464.

WHARTON C.W., CROOK E.M. ET BROCKLEMURST K. (1968)
Eur. J. Biochem., 6, 565.

WILSON R.J.A., KAY G. ET LILLY M.A.
Biochem. J., 108, 845.

WILSON R.J.A. ET LILLY M.A. (1969)
Biotech. Bioeng., 11, 349.

LE TRAVAIL PRESENTE DANS CETTE THESE A FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS SUIVANTES :

Membranes à activité enzymatique. Synthèses de membranes à enzymes liées par covalence. Caractérisation de l'activité catalytique par diffusion-réaction.
C.R. Acad. Sciences (1968), 266, 1431.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E., AVRAMEAS S. ET BROUN G.

Méthode de détermination du K_M réel d'une enzyme par le régime stationnaire d'une membrane en activité enzymatique.
J. Chim. Phys. (1969), 66, 391.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E., BROUN G. ET GEFFROY J.

Enzymatically active membranes : some properties of cellophane membranes supporting cross-linked enzymes.
Bioch. Bioph. Acta (1969), 185, 260.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G., AVRAMEAS S. ET SELEGNY E.

Enzymes en phase insoluble.
C.R. Acad.. Sciences (1969), 269, 1330.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E. ET BROUN G.

Feedback regulation of enzymes covalently bound in a membrane (1969).

Congrès International de Biophysique CAMBRIDGE (U.S.A.)

EN COLLABORATION AVEC BROUN G. ET SELEGNY E.

CO_2 transport across a film bearing carbonic anhydrase.
Congrès de la F.E.B.S. MADRID (1969).
Reprint 1161, 356.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G., SELEGNY E. ET DELPECH B.

Phénomènes oscillatoires dépendant de la distance et transport actif dans les membranes enzymatiques en régime stationnaire.

C.R. Acad. Sciences, D (1969), 269, 1377.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E. ET BROUN G.

Biologic membranes and their models. Discussion conference on models of biopolymers, structures and fonction.
(1970) MARIENBAD.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E. ET BROUN G.

New membranes regulation and transport models based on film bearing reticulated enzymes.

Colloque "Protides of Biological Fluids"
BRUGGE (1970), 75, 54.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G. ET SELEGNY E.

Calcul et réalisation expérimentale de transport actif de molécules neutres in vitro, à l'aide de membranes structurées multi-couches, bienzymatiques séquentielles.

C.R. Acad. Sciences, D (1970), 271, 1423.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G. ET SELEGNY E.

Enzymatical membranes, kinetics, regulation and transports.

Journal de physiologie végétale.

Meeting on membrane phenomena (1970) ROUEN.

EN COLLABORATION AVEC SELEGNY E. ET BROUN G.

Numérical solutions of equations of time-dependant phenomena.

Journal de physiologie végétale.

Meeting on membrane phenomena (1970) ROUEN.

EN COLLABORATION AVEC KERNEVEZ J.P., SELEGNY E. ET BROUN G.

Monoenzymatical model membranes, diffusion-reaction phenomena.

A paraître dans J. of Membrane Biology.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G. ET SELEGNY E.

Structured bienzymatical models formed by sequential enzymes bound into artificial supports, achievement of active transport of glucose.

A paraître dans J. Mol. Biol.

EN COLLABORATION AVEC BROUN G. ET SELEGNY E.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. METHODES DE REALISATION DE MEMBRANES ENZYMATIQUES ET PROPRIETES DES ENZYMES RETICULEES DANS CES MEMBRANES 5

I. Revue bibliographique sur les enzymes insolubilisees . 5

A - ADSORPTION PHYSIQUE

B - INCLUSION

C - LIAISON COVALENTE ENTRE L'ENZYME ET LE SUPPORT

D - RETICULATION DES ENZYMES A L'INTERIEUR OU ADSORBEES SUR UN SUPPORT

II. Materiel et Methodes 10

A - METHODE DE FIXATION DES ENZYMES ET DE REALISATION DES MEMBRANES

B - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

III. Resultats Experimentaux 19

A - ENZYMES FIXEES EFFICACEMENT PAR NOS METHODES ET ACTIVITE CONSERVEE APRES FIXATION

B - PROPRIETES DES ENZYMES FIXEES

CHAPITRE II. ETUDE THEORIQUE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE ET DES FLUX DE SUBSTRAT DANS UNE MEMBRANE ACTIVE 28

I. Mise_en_Equation_du_Systeme 29

A - ENZYME EN PHASE SOLUBLE

B - ENZYME EN PHASE INSOLUBLE

II. Solutions_a_l'Etat_Stationnaire 32

1. SOLUTIONS ANALYTIQUES PARTICULIERES

2. RESOLUTION APPROCHEE

3. PROFILS A L'ETAT STATIONNAIRE

4. PARTICULE SPHERIQUE

III. Solutions_en_Regime_d'Evolution 48

A - SYSTEME MONOENZYMATIQUE

B - SYSTEME MULTIENZYMATIQUE AVEC FEED-BACK

CHAPITRE III. ETUDE EXPERIMENTALE EN DIFFUSION REACTION DE MEMBRANES PORTEUSES D'ENZYMES . MODELES DE REGULATION 59

I. Materiel et Methodes 59

A - MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

B - MESURE DES FLUX , DETERMINATION EXPERIMENTALE DES COEFFICIENTS EXPERIMENTAUX

C - MESURE DES K_M REELS DE L'ENZYME APRES RETICULATION DANS LE SUPPORT MEMBRANAIRE

D - REALISATION DES MEMBRANES

II. Resultats Experimentaux 64

A - SYSTEMES SYMETRIQUES

B - SYSTEMES ASYMETRIQUES

CHAPITRE IV. ETUDE DE MEMBRANES HOMOGENES ET STRUCTUREES PORTEUSES D'ENZYMES SEQUENTIELLES. MODELE DE TRANSPORT 83

I. Analyse_Theorique 83

II. Membrane_Homogene_Porteuse_d'un_Systeme Bienzymatique_Sequentiel 89

A - MATERIEL ET METHODES

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

III. Membranes_Structurees_Porteuses_D'Activite Sequentielles 94

A - MATERIEL ET METHODE

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

DISCUSSION 102